

**Nachweis von HER2/neu-positiven zirkulierenden epithelialen Tumorzellen im
Blut von Patientinnen mit HER2/neu-negativem Brustkrebs mit Hilfe der
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem akademischen Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Taubald, Benjamin
geboren am 16.06.1986

Gutachter:

1. PD Dr. med. Katharina Pachmann (Bayreuth)
2. Prof. Dr. Ingo Runnebaum (Jena)
3. Prof. Dr. Robert Schwab (Koblenz)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. Januar 2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	3
2.2 Prognose- und Prädiktionsfaktoren	3
2.3 HER2/neu-Rezeptor.....	7
2.4 Verfahren zur Bestimmung des HER2-Status	12
2.5 Verfahren zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen.....	18
2.6 EpCAM.....	20
2.7 Therapie des invasiven Mammakarzinoms	24
3 Ziele der Arbeit	36
4 Material und Methoden.....	37
4.1 Patientenkollektiv	37
4.2 Materialien und Reagenzien	38
4.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	38
4.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Kit (FISH-Kit)	39
4.2.3 Labormaterial und Labortechnik	40
4.2.4 Optische Geräte	41
4.2.5 Mess- und Auswertungssoftware.....	42
4.3 Methoden	42
4.3.1 Scan^R-Routinemessung	43
4.3.1.1 Das Prinzip der Scan^R-Messung (MAINTRAC®-Methode).....	43
4.3.1.2 Aufbereitung der Blutproben	43
4.3.1.3 Probenanalyse – Messung und Auswertung.....	44
4.3.2 HER2/neu-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an CETC	46
4.3.2.1 Das Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	46
4.3.2.2 Durchführung	47
4.3.2.3 Analyse der Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop	49

4.4 Statistische Methoden.....	50
5 Ergebnisse	51
5.1 Zusammensetzung des Patientengutes	51
5.2 Einteilung in Untergruppen.....	56
5.3 Auswertung	57
5.3.1 Betrachtung der Einzelanalysen	57
5.3.2 Betrachtung der Verlaufsanalysen.....	67
5.3.3 Einzelfallbeobachtungen	75
5.3.3.1 EpCAM-negative Zelle mit HER2-Amplifikation	75
5.3.3.2 Polysome CETC.....	76
6 Diskussion	77
6.1 Bewertung der Methoden.....	77
6.1.1 Bewertung der Methode zur Messung der CETC	77
6.1.2 Bewertung der Methode zur Bestimmung des HER2-Status an CETC.....	80
6.2 Diskussion der Ergebnisse.....	82
6.3 Ausblick.....	88
7 Schlussfolgerung	93
8 Literaturverzeichnis.....	94
9 Anhang	113
Danksagung.....	113
Ehrenwörtliche Erklärung.....	114
Tabellenverzeichnis	115
Abbildungsverzeichnis	117

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7- Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
ADCC	antikörper abhängige zelluläre Cytotoxizität
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologie und Onkologie
ASCO	American Society for Clinical Oncology
ATP	Adenosintrinukleotidphosphat
BET	Brusterhaltende Therapie
C(E)TC	zirkulierende (epitheliale) Tumorzellen
Ca	Karzinom
ca.	zirka
CAM	Cell Adhesion Molecule
CD45	Cluster of Differentiation 45
CEP	chromosome enumeration DNA probe
ChT	Chemotherapie
CISH	Chromogen-in-situ-Hybridisierung
CK	Cytokeratin
CMF-Schema	Cyclophosphamid-Methotrexat-5-Fluoruracil-Schema
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DFS	krankheitsfreies Überleben
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DTC	disseminierte Tumorzellen
EGF(R)	epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittelagentur)
EMT	epithelial to mesenchymal transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ER	Östrogenrezeptor
FDA	amerikanische Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	histologischer Tumorgrad (Grading)
GEKID	Gesellschaft epidemiologischer Krebsregister in Deutschland
HEA	humanes epitheliales Antigen
HER2(/neu)	human epidermal growth factor receptor 2
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunofluoreszenz
IGF1	Insulin-like-Growth-Factor 1
IgG1	Immunglobulin G1

Ki-67/MIB-1	Ki-67-Antigen zur Identifikation sich teilender menschlicher Zellen (Proliferationsmarker), MIB-1 ist ein monoklonaler Antikörper gegen Ki-67
LK	Lymphknoten
LSC	Laser Scanning Cytometer
LSI	locus specific identifier
M0BC	nicht metastasierter Brustkrebs
MBC	metastasierter Brustkrebs
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian Target of Rapamycin, Enzym der Signaltransduktion zur Regulation von Wachstum, Proliferation und Motilität von Zellen
N	Nodalstatus
neg.	negativ
OS	Gesamtüberleben
Pat.-Nr.	Patientennummer
PBC	primärer Brustkrebs
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PE-Puffer	PBS-EDTA-Puffer
PFS	progressionsfreies Überleben
PgR	Progesteronrezeptor
pos.	positiv
PR	Progesteronrezeptor
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	quantitative real time Polymerasekettenreaktion
Ras/MAP-Kinase-Signalweg	mehrstufiger Signaltransduktionsweg über MAP-Kinasen (ras/mitogen activated protein)
RKI	Robert Koch Institut
SISH	Silber-in-situ-Hybridisierung
T	Tumorgröße
Tab.	Tabelle
TGF- α	Transforming Growth Factor alpha
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TZ	Tumorzelle
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
USCAP	United States & Canadian Academy of Pathology
VEGF	vaskulärer epidermaler Wachstumsfaktor
vs.	versus
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Die HER2-Rezeptorüberexpression oder -Genamplifikation ist der wichtigste prädiktive Faktor für das Ansprechen eines Mammakarzinoms auf eine Anti-HER2-Therapie. Jedoch haben nur etwa 20-30% der Patientinnen einen Primärtumor mit einem positiven HER2-Status, sodass bisher nur wenige von einer solchen Therapie profitieren können. In mehreren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass sich der HER2-Status des Primärtumors von dem seiner Metastasen, seiner disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und seiner im Blut zirkulierenden Tumorzellen unterscheiden kann, sodass möglicherweise auch Patientinnen mit einem HER2-negativen Primärtumor von einer zielgerichteten Therapie profitieren könnten. Da in der klinischen Praxis eine Reevaluation des HER2-Status in Metastasen nicht immer möglich und meist mit einem invasiven Eingriff verbunden ist, scheint die Bestimmung des HER2-Status an zirkulierenden Tumorzellen eine potentielle Alternative zu sein.

Ziel der Arbeit war es zu überprüfen, ob wir mithilfe der MAINTRAC®-Methode zur Detektion zirkulierender epithelialer Tumorzellen in Verbindung mit einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis (einer Amplifikation) des HER2-Gens, HER2-positive zirkulierende Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor finden. Hierzu wurden bei 56 Patientinnen ein- oder mehrfach Blutproben entnommen und mittels Scan[^]R-Messung auf zirkulierende epitheliale Tumorzellen untersucht. Parallel erfolgte die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einem anerkannten HER2-Sondenkit der Firma PathVysion® zum Nachweis der Genamplifikation.

Bei allen Patientinnen waren mindestens eine CETC mit 6 oder mehr HER2-Genamplifikationen nachweisbar. Insgesamt 32 (57,1 %) Patientinnen waren entsprechend unserer Grenzwertdefinition als HER2-positiv zu bewerten. Es konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen dem HER2-Status der CETC und verschiedenen anerkannten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms nachgewiesen werden. Bei Patientinnen, die im Verlauf mehrfach untersucht wurden, zeigte sich, dass sich der HER2-Status unter verschiedenen Therapien in beide Richtungen ändern kann. Desweiteren wurde der Verlauf des Anteils HER2-amplifizierter CETC mit der Kinetik der detektierten CETC-Zahl verglichen. Dabei ergaben sich sowohl gleichsinnige, als auch inverse Verläufe.

Es kann geschlussfolgert werden, dass bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor in einer relevanten Zahl HER2-positive CETC gefunden wurden. Der Anteil HER2-positiver CETC liegt in dieser Arbeit über den bisher veröffentlichten Zahlen von durchschnittlich 30% in anderen Studien. Ob die Ergebnisse dieser Arbeit reproduzierbar sind, muss allerdings an einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden. Inwieweit die Bestimmung des HER2-Status an CETC einen prädiktiven Nutzen für das Ansprechen auf eine Therapie mit Trastuzumab oder Lapatinib hat oder hilfreich bei der Therapieüberwachung ist, muss in weiteren Studien überprüft werden.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist nach Daten der WHO mit über 1,3 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr der häufigste bösartige Tumor der Frau. Zudem sterben weltweit mehr als 450.000 Frauen pro Jahr am Brustkrebs. Damit ist das Mammakarzinom zugleich das häufigste zum Tode führende Malignom der Frau (Ferlay et al. 2010).

Da in Deutschland bisher noch keine einheitliche bundesweite und vollständige Erfassung von Krebserkrankungen existiert, können Inzidenzen und Mortalitätsraten bisher nur geschätzt werden. Nach Hochrechnungen des Robert Koch-Instituts erkrankten im Jahr 2008 rund 72.000 Frauen an Brustkrebs (Robert Koch-Institut 2012). Zudem sind nach Angaben der Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland im Jahr 2010 allein im Freistaat Thüringen 1768 Frauen an Brustkrebs erkrankt. Außerdem wurden 2010 414 brustkrebsbedingte Todesfälle in Thüringen registriert (GeKID 2013). Diese Zahlen untermauern, dass das Mammakarzinom eine immense Bedeutung im klinischen Alltag besitzt und daher die Verbesserung von Diagnostik und Therapie nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung sein muss.

2.2 Prognose- und Prädiktionsfaktoren

Die Behandlung des Mammakarzinoms erfolgt zunehmend individualisiert auf der Grundlage verschiedener Prognose- und Prädiktionsfaktoren, die im Vorfeld für jede Patientin zur Therapieplanung evaluiert werden (Kreienberg et al. 2010; Preiß et al. 2012). Dabei dienen Prognosefaktoren der Abschätzung des Krankheitsverlaufs hinsichtlich des Auftretens von späteren Rezidiven, Metastasen oder sogar eines tumorbedingten Todes. Prädiktive Faktoren versuchen hingegen das Ansprechen eines Tumors, also dessen Sensitivität oder Resistenz, gegenüber einer bestimmten Therapie, vorherzusagen (Böcker & Decker 2008; Janni 2007; Kreienberg et al. 2010).

Zu den etablierten Prognosefaktoren, die, mit Ausnahme des Alters, alle vom Pathologen bestimmt werden, zählen:

- Axillärer Lymphknotenstatus (N-Status)
- Tumorgroße (T-Status)
- Alter
- Grading
- Histologischer Typ
- Lymphangiosis und Hämangiosis carcinomatosa
- Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus
- HER2/neu-Status (Überexpression, Amplifikation).

Einige dieser prognostischen Marker, wie beispielsweise der Hormonrezeptorstatus oder der HER2/neu-Status, haben gleichzeitig auch einen prädiktiven Aussagecharakter (Böcker & Decker 2008).

Der axilläre Lymphknotenstatus gilt weiterhin als stärkster unabhängiger prognostischer Faktor und ist bei Tumorbefall mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Außerdem besteht eine direkte positive Korrelation zwischen der Zahl der befallenen Lymphknoten und dem Überleben (Bundred 2001; Carter et al. 1989; Fisher et al. 1983; Kreienberg et al. 2010).

Die Tumorgroße ist ein weiterer unabhängiger prognostisch relevanter Faktor (Cianfrocca & Golstein 2004). Dabei gilt, je größer der Tumor, umso höher ist das Risiko für einen positiven axillären Nodalstatus und desto mehr axilläre Lymphknoten sind befallen (Carter et al. 1989; Cianfrocca & Goldstein 2004). Zudem steigt auch das Rezidiv- und Metastasierungsrisiko mit zunehmender Tumorgroße (Cianfrocca & Goldstein 2004; Koscielny et al. 1984; Rosen et al. 1993).

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass der Effekt der Tumorgroße auf die Rezidivfreiheit und das Überleben bei nodal-positiven Patientinnen zwar vom stärkeren Prognosefaktor Lymphknotenbefall überlagert wird, aber dennoch auch bei nodal-negativen Patientinnen eine stetige (wenn auch geringere) Abnahme der 5-Jahres-Überlebensrate und eine Verkürzung des rezidivfreien Intervalls mit zunehmender Tumorgroße festgestellt werden konnte (Carter et al. 1989; Clark et al. 1988; Rosen et al. 1993, Cianfrocca & Goldstein 2004, Kreienberg et al. 2010).

Dass unterdessen auch kleinere Tumoren mit aggressiven tumorbiologischen Eigenschaften ebenfalls eine schlechte Prognose haben können, sollte an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben (Kreienberg et al. 2010).

Auch das histologische Tumorgading stellt einen wichtigen Prognosefaktor dar. Dabei stehen dem Pathologen verschiedene Scoring-Systeme wie das von der AGO empfohlene nukleäre Grading nach Elston und Ellis und die Scarff-Bloom-Richardson-Klassifikation zur Verfügung (Böcker & Decker 2008; Cianfrocca & Goldstein 2004; Kreienberg et al. 2010).

Insbesondere schlecht- oder entdifferenzierte Tumoren sind mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert (Cianfrocca & Goldstein 2004; Le Doussal et al. 1989).

Außerdem gibt es einige histologische Subtypen des duktales Mammakarzinoms, die mit einer besseren Prognose assoziiert sind. Hierzu zählen unter anderem das tubuläre, das muzinöse, das papilläre und das medulläre Karzinom (Bundred 2001; Cianfrocca & Goldstein 2004; Sehouli 2009).

Eine Infiltration des Tumors in Lymph- oder Blutgefäße erhöht ebenfalls das Rezidiv- und Sterberisiko der Patientinnen (Cianfrocca & Goldstein 2004; Neville et al. 1992; Rosen et al. 1989).

Der Nachweis von Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren beim invasiven Mammakarzinom scheint sowohl prognostisch als auch prädiktiv relevant zu sein (Cianfrocca & Goldstein 2004). Die prognostische Bedeutung nimmt jedoch mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit ab (Janni 2007). Während ein negativer Hormonrezeptorstatus in den ersten Jahren der Erkrankung mit einem höheren Rezidiv- und Metastasierungsrisiko sowie einem kürzerem Gesamtüberleben assoziiert ist, kehrt sich dieser Negativeffekt nach einigen Jahren um. Voraussetzung dafür ist, dass bis zu diesem Zeitpunkt weder ein Lokalrezidiv noch eine Fernmetastase aufgetreten sind (Cianfrocca & Goldstein 2004; Fisher et al. 1988; Hilsenbeck et al. 1998). In dieser Konstellation erhöht sich dann sogar die Chance krankheitsfrei zu bleiben gegenüber hormonrezeptor-positiven Patientinnen (Kreienberg et al. 2010). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Mammakarzinome, die Östrogen- und/ oder Progesteronrezeptoren exprimieren, langsamer wachsen und erst spät rezidivieren (Cianfrocca & Goldstein 2004). Dennoch gibt es auch eine

Reihe von Studien, die zeigen, dass ein positiver Hormonrezeptorstatus mit einem längeren Gesamtüberleben einher geht (Bundred 2001; Kreienberg et al. 2010; Silvestrini et al. 1995).

Während die prognostische Aussagekraft also relativ beschränkt ist, ist der prädiktive Wert für das Ansprechen einer endokrinen Therapie unbestritten. Mit der höchsten Sensitivität ist bei gleichzeitiger Ausprägung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren zu rechnen (Arpino et al. 2005; Williams et al. 1987). Bei der Konstellation eines positiven Östrogenrezeptorstatus und eines negativen Progesteronrezeptorstatus ist hingegen von einer geringeren Wirksamkeit auszugehen (Arpino et al. 2005; Bundred 2001; Ravdin et al. 1992).

Mit der Bestimmung des HER2/neu-Status durch den Pathologen steht ein weiterer prognose- und therapierelevanter Marker zur Verfügung, auf den im Kapitel HER2 näher eingegangen werden soll.

Neben den bereits erwähnten Faktoren werden und wurden eine Reihe weiterer, neuerer Marker hinsichtlich ihres prognostischen und prädiktiven Wertes untersucht. Viele von ihnen weisen insbesondere auf einen aggressiveren Tumor hin, da sie an Prozessen wie Tumorzellproliferation, Invasion und Metastasierung beteiligt sind und diese fördern oder vorantreiben. Der Proliferationsmarker Ki-67/MIB-1 ist ein nukleäres Antigen, welches ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert wird und immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Bundred 2001; Kreienberg et al. 2010). Bisher konnte nicht nur ein prognostischer Zusammenhang zwischen einer starken Ausprägung des Antigens und einem schlechteren Überleben, sondern auch eine prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie bei hohen Proliferationsraten gezeigt werden (Brown et al. 1996; Bundred 2001; Gaglia et al. 1993; Kreienberg et al. 2010). Der Grenzwert, ab wann von hoher Proliferation gesprochen werden kann, liegt derzeit bei 14% der Zellen mit Nachweis von Ki-67 (Goldhirsch et al. 2011). Neben Ki-67 gibt es noch weitere Proliferationsmarker wie die sogenannte S-Phase-Fraktion und den Thymidin-labelling Index, die Gegenstand der Forschung sind (Bundred 2001; Cianfrocca & Goldstein 2004).

Anhand von Genexpressionsanalysen konnten zudem verschiedene molekularbiologische Mammakarzinomsubtypen definiert werden, die ebenfalls eine prognostische und prädiktive Relevanz besitzen. Diese molekularen Subtypen

korrelieren wiederum stark mit bestimmten immunhistochemischen Konstellationen hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus, des HER2-Status, sowie des Proliferationsindex, sodass zwischen den undifferenzierten, triple-negativen, basal-like-Karzinomen, den endokrin responsiven luminalen Karzinomen sowie den HER2-positiven Karzinomen unterschieden werden kann (Harbeck 2013).

Zu den Faktoren, die vor allem die Invasivität und metastatische Aktivität näher beschreiben, zählen neben dem Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp und seinem Inhibitor auch die Messung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut (Cianfrocca & Goldstein 2004; Kreienberg et al. 2010).

Die Messung von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen ist eine nicht-invasive Methode, die lediglich eine periphere venöse Blutentnahme erfordert und die neben der Prognoseabschätzung die Möglichkeit eines Therapiemonitorings bieten könnte. Damit könnte dieser Ansatz zu einer weiteren Individualisierung der Therapie beitragen und somit das Outcome von Patientinnen verbessern (Mavroudis 2010; Oakman et al. 2010).

Es konnte in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Detektionsmethoden für zirkulierende Krebszellen gezeigt werden, dass der Nachweis von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit Brustkrebs vor Therapiebeginn mit einem kürzeren krankheitsfreien und Gesamtüberleben assoziiert ist (Cristofanilli et al. 2004; Ignatiadis et al. 2007b; Stathopoulou et al. 2002; Xenidis et al. 2006). Dieser Zusammenhang gilt sowohl für die metastasierte Situation, als auch für frühe, lokalisierte Erkrankungsstadien. Desweiteren scheint ein Nachweis oder Anstieg von zirkulierenden Tumorzellen nach einer adjuvanten Chemotherapie ebenfalls mit einem schlechteren Outcome assoziiert zu sein (Mavroudis 2010; Pachmann et al. 2008b; Xenidis et al. 2009).

2.3 HER2/neu-Rezeptor

Der HER2-Rezeptor ist ein Wachstumsfaktorrezeptor der „epidermal growth factor receptor“ (EGFR)-Familie, die wiederum die Klasse I der Rezeptortyrosinkinasen bildet (Witton 2003; Witton et al. 2003; Zwick et al. 2002). Die EGFR-Familie besteht aus vier, in ihrer Struktur sehr ähnlichen, Rezeptortypen (Witton et al. 2003; Zwick et al. 2002). Sie setzen sich aus einer extrazellulären (N (amino)-terminalen),

ligandenbindenden Domäne, einem transmembranösen lipophilen Abschnitt und einer intrazellulären (cytoplasmatischen) Tyrosinkinasedomäne mit C-terminalem Aminosäureschwanz zusammen (Cho et al. 2003; Gullick 2001; van der Geer et al. 1994; Witton 2003).

Die Rezeptoren unterscheiden sich jedoch in ihrer Ligandenspezifität (Koutras et al. 2010) und Kinasefunktion (Aktivierung unterschiedlicher Pathways) (Carraway et al. 1994a; Karunagaran et al. 1996; Peles et al. 1993). Ihre Funktion besteht in der Weiterleitung von extrazellulären Wachstumsfaktorsignalen nach intrazellulär über die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, die sich auf die Genexpression im Zellkern auswirken und darüber zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Apoptose beeinflussen (Moasser 2007; Ménard et al. 2003; Ross et al. 2009; Yarden et al. 2001; Zwick et al. 2001).

Die Signalweiterleitung wird durch die Bindung von spezifischen Liganden an der Extrazellulärdomäne initiiert. Hierdurch werden die Rezeptoren, die ursprünglich als Monomer in der Zellmembran verankert sind, aktiviert. Dies wiederum führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die eine Zusammenlagerung zweier Rezeptormonomere, die sogenannte Dimerisierung, ermöglicht (Moasser 2007; Rubin et al. 2001).

Durch Vereinigung zweier gleicher Rezeptortypen entstehen dabei Homodimere. Jedoch ist auch die Bildung von Heterodimeren aus zwei verschiedenen EGF-Rezeptortypen möglich (Ross et al. 2009).

Infolge der Dimerisierung kommt es zu einer Transphosphorylierung der Tyrosinreste der Intrazellulärdomänen des Rezeptorkomplexes (Harbeck et al. 2010; van der Geer et al. 1994; Zwick et al. 2001). Erst durch diesen Vorgang erhält die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne ihre volle Aktivität, die es ermöglicht Adapterproteine zu phosphorylieren um das Signal über verschiedene Pathways, wie den Ras/MAP-Kinase-Signalweg, der die Proliferation beeinflusst, oder den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/Akt-Weg, in den Zellkern weiterzuleiten (Moasser 2007; Ross et al. 2009; Zwick et al. 2001).

Liganden der HER-Familie sind Wachstumsfaktoren, die alle ein EGF-ähnliches Motiv aus etwa 50 bis 55 Aminosäuren und sechs hochkonservierten Cysteinresten

gemeinsam haben und jeweils zwei Bindungsstellen für die Rezeptoren besitzen (Rubin & Yarden 2001; Tzahar et al. 1997; Tzahar et al. 1998; Yarden 2001). Hinsichtlich der Bindungsspezifität werden drei Ligandengruppen unterschieden. Während EGF, Transforming Growth Factor alpha (TGF- α) und Amphiregulin (AR) spezifisch an HER1 (EGFR) binden, interagieren die Splicevarianten der Neureguline (Hereguline) ausschließlich mit HER3 und HER4 (Gullick 2001; Nagy et al. 1999; Rubin & Yarden 2001).

Nur die Wachstumsfaktoren Epiregulin und Betacellulin sowie der Heparin-bindende EGF sind in der Lage, sowohl an HER1, als auch an HER3 und HER4 zu binden (Nagy et al. 1999; Rubin & Yarden 2001).

Besonderheiten und Charakteristika von HER2:

Der HER2-Rezeptor ist der einzige seiner Familie, für den bisher kein Ligand identifiziert werden konnte (Baulida et al. 1996; Hynes et al. 1994; Tzahar & Yarden 1998).

Dennoch ist er keineswegs funktionslos. Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, die zu einer Aktivierung des Rezeptors und nachgeschalteter Signalwege führen (DiGiovanna et al. 2002; Moasser 2007; Nagy et al. 1999; Zwick et al. 2001).

Unter anderem wird HER2 bei der Bildung von Heterodimeren als Korezeptor herangezogen und kann infolgedessen transaktiviert werden (Carraway et al. 1994b; DiGiovanna et al. 2002; Rubin & Yarden 2001; Stern et al. 1988). Da alle Liganden mit ihrer zweiten Bindungsstelle HER2 als Korezeptor einbeziehen können, ist HER2 in der Lage, mit jedem seiner Familienmitglieder zu interagieren (Rubin & Yarden 2001; Tzahar & Yarden 1998). So induziert die Bindung von Neuregulinen Heterodimere mit HER3 oder HER4 (Burden et al. 1997; Pinkas-Kramarski et al. 1998; Rubin & Yarden 2001; Tzahar et al. 1996) während EGF-ähnliche Liganden zur Interaktion mit dem EGF-Rezeptor (HER1) führen (Pinkas-Kramarski et al. 1997; Pinkas-Kramarski et al. 1996; Rubin & Yarden 2001).

Insbesondere bei Überexpression, aber auch bei normaler Ausprägung, gilt der HER2-Rezeptor als bevorzugter Interaktionspartner bei der Dimerisierung (Graus-Porta et al. 1997; Ménard et al. 2003; Rubin & Yarden 2001; Tzahar et al. 1996; Tzahar & Yarden 1998).

Da auch der HER3-Rezeptor aufgrund seiner inaktiven intrazellulären Tyrosinkinasedomäne auf die Bildung von Heterodimeren angewiesen ist, scheint es nicht verwunderlich, dass sich, vor allem in Tumorzellen, insbesondere HER2-HER3-Heterodimere sehr häufig ausbilden (Alroy et al. 1997; Citri et al. 2003; Citri et al. 2006; Harbeck et al. 2010; Pinkas-Kramarski et al. 1998; Yarden 2001). Die HER2-HER3-Heterodimere bilden eine onkogene Einheit und gelten zudem als am stärksten mitogene Kombination (Holbro et al. 2003; Yarden 2001), da sie eine gesteigerte Transformationsaktivität der Zellen zur Folge haben (Lohrisch et al. 2001; Yarden 2001; Yarden & Sliwkowski 2001).

Außerdem fand man heraus, dass, aufgrund einer langsameren Ligandendissoziation (Alroy & Yarden 1997) und einer verzögerten Internalisation des Rezeptorkomplexes (Baulida et al. 1996; Pinkas-Kramarski et al. 1996; Yarden 2001), HER2-Heterodimere besonders langlebig sind und stärkere Signale generieren (Karunakaran et al. 1996; Klapper et al. 1999; Olayioye 2001; Yarden 2001).

Ein weiterer Aktivierungsmechanismus basiert auf dem konstitutiv aktivierten, dimerisierungsbereiten Zustand von HER2 (Cho et al. 2003; Garrett et al. 2003; Moasser 2007). Dieser ermöglicht bei Überexpression von HER2 eine spontane, ligandenunabhängige Homodimerisierung, die wiederum die Tyrosinkinaseaktivität in Gang bringt. Damit sind auch HER2-Homodimere in der Lage, kontinuierlich Signale weiter zu leiten und verschiedene Kaskaden zu aktivieren (Hynes & Stern 1994; Kurbel 2006; Neve et al. 2001; Olayioye 2001; Pegram et al. 2000; Witton 2003).

Auch eine somatische Punktmutation in der Transmembrandomäne könnte ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivierung von HER2 führen (DiGiovanna et al. 2002; Moasser 2007). Eine solche spontane Mutation, wie sie am HER2-Analogon in Ratten beschrieben wurde (Bargmann et al. 1986; Karunakaran et al. 1996; Weiner et al. 1989; Zwick et al. 2001), scheint jedoch nicht beim Menschen aufzutreten (Segatto et al. 1988).

Jedoch wurde ein genetischer Polymorphismus innerhalb der Transmembrandomäne beschrieben, der die Dimerisierung fördern und die Signaltransduktion steigern kann (Fleishman et al. 2002; Moasser 2007; Xie et al. 2000; Zwick et al. 2001).

Ein weiterer möglicher Aktivierungsweg scheint die proteolytische Abspaltung der Extrazellulärdomäne zu sein. Dieser als Shedding bezeichnete Prozess hat ebenfalls eine konstitutive Kinaseaktivierung der trunkierten Rezeptorform (p95HER2) zur

Folge (DiGiovanna et al. 2002; Lohrisch & Piccart 2001; Nahta et al. 2006; Pohlmann et al. 2009).

HER2-Überexpression/Amplifikation:

HER2-Rezeptoren werden weitgehend in epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert und spielen eine fundamentale Rolle in der Entwicklung verschiedener Organe (Graus-Porta et al. 1997). Eine Ausnahme bilden hämatopoetische Zellen, in denen keine Ausprägung von HER2 nachgewiesen werden kann (Hynes & Stern 1994; Yarden & Sliwkowski 2001). HER2 scheint pränatal insbesondere an der Entwicklung der Trabekulae des Myokards beteiligt zu sein. Postnatal wird HER2 unter anderem eine Rolle bei der Brustentwicklung und dem Brustwachstum zugeschrieben (Yarden 2001). Diese normalen Expressionslevel sind in einigen Karzinomen deutlich gesteigert (Tzahar & Yarden 1998).

Wie bereits zuvor beschrieben, ist die Überexpression ein entscheidender Faktor bei der Dysregulation des Signaltransduktionsvorganges und damit auch bei der malignen Transformation von Tumorzellen.

Etwa 20-30 % aller invasiven Mammakarzinome weisen eine Überexpression des HER2-Rezeptors auf (Hynes & Stern 1994; Ross et al. 2009; Rubin & Yarden 2001; Slamon et al. 1987; Slamon et al. 1989).

Die häufigste Ursache für eine Überexpression ist eine Amplifikation des HER2-Protoonkogens, welches sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 befindet (Neve et al. 2001; Rubin & Yarden 2001).

Eine Überexpression des HER2-Proteins beziehungsweise eine Amplifikation des Protoonkogens ist jedoch nicht ausschließlich für das Mammakarzinom typisch, sondern wurde auch bei einer Reihe anderer Tumoren gefunden.

Sowohl Tumoren des Verdauungstraktes (GIT) wie das Oesophagus-, Magen-, Pankreas- und Kolonkarzinom (Hynes & Stern 1994; Mimura et al. 2005; Tzahar & Yarden 1998; Yano et al. 2006), als auch weitere gynäkologische Tumoren wie das Ovarial-Karzinom (Berchuck et al. 1990; Slamon et al. 1989) und das Endometrium-Karzinom (Morrison et al. 2006) können eine Überexpression und/ oder Amplifikation aufweisen.

Seltener fand man auch in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches (Oropharynx) (Khan et al. 2002), der Lunge (NSCLC) (Hirsch et al. 2002; Schneider et al. 1989) und der Blase (Latif et al. 2003; Tzahar & Yarden 1998) eine erhöhte HER2-Ausprägung.

Außer der Amplifikation gelten auch noch transkriptionelle und posttranskriptionelle Dysregulation als potentielle, wenn auch seltene, Ursache für die Überexpression (Gullick 2001; Neve et al. 2001; Rubin & Yarden 2001; Slamon et al. 1989).

2.4 Verfahren zur Bestimmung des HER2-Status

Während eine normale Zelle lediglich zwei Genkopien besitzt, weisen amplifizierte Zellen bis zu 50 Genkopien auf (Kallioniemi et al. 1992; Moasser 2007). Dies führt zu einer gesteigerten Transkription des HER2-Gens und damit zu erhöhten mRNA-Konzentrationen in der Zelle, welche infolge der Translation zu einer gesteigerten Expression des Proteins auf der Zelloberfläche führen wodurch es zu einer gesteigerten Expression des Proteins auf der Zelloberfläche kommt (Neve et al. 2001). Deshalb kann die Zahl der HER2-Rezeptoren auf Tumorzellen 100fach höher sein, sodass sich, statt der normalen Expression von 20.000 bis 50.000 Rezeptoren, bis zu 2 Millionen Rezeptormoleküle auf der Oberfläche befinden (Konecny et al. 2003; Lohrisch & Piccart 2001; Moasser 2007; Pegram & Slamon 2000; Sauter et al. 2009).

Somit besteht prinzipiell die Möglichkeit den HER2-Status auf Protein-, RNA- und DNA-Ebene mit verschiedenen histopathologischen und molekularen Verfahren zu bestimmen (Burandt et al. 2010; Thor 2001; van de Vijver 2002).

Während RNA-Untersuchungen zum Nachweis einer gesteigerten Transkription des HER2-Gens sowie die Quantifikation von im Serum nachweisbaren HER2-Proteinfragmenten bisher keine Relevanz in der klinischen Praxis besitzen (Burandt & Sauter 2010; Harris et al. 2007; van de Vijver 2002), haben sich hingegen der immunhistochemische Rezeptornachweis und der Nachweis der Genamplifikation mittels FISH oder CISH in der klinischen Routine bewährt (Burandt & Sauter 2010; Rüschoff et al. 2009; Wolff et al. 2007). Eine Übersicht über die verschiedenen Nachweismethoden gibt Tabelle 1.

Nachweisprodukt		Nachweismethode
DNA-Ebene	Genkopienzahl (Amplifikation)	<u>FISH:</u> <i>PathVysion (Vysis/Abbott)</i> <i>PharmDx-Kit</i> <u>Einfarben-ISH:</u> <i>Spot-Light-CISH (Invitrogen)</i> <i>ZytoDot Spec (Zytovision)</i> <u>Zweifارben-ISH:</u> <i>DuoCISH (Dako)</i> <i>BDISH-Assay (Roche-Ventana)</i> <u>Quantitative PCR:</u> <i>DNA-Quantif. Kit (Roche)</i>
	mRNA-Transkripte	<u>qRT-PCR:</u> <i>RNA-Quantif. Kit (Roche)</i>
Protein-Ebene	Rezeptorproteinüberexpression	<u>Immunhistochemie (IHC):</u> <i>HercepTest (A0485 polyclonal, Dako)</i> <i>PathWay (4B5, Roche-Ventana)</i> <u>ELISA:</u> <i>HER2/neu Assay (Bayer, Oncogene)</i>
	Serum-Extrazellulärdomäne von HER2	

Tab. 1 Gebräuchliche HER2-Test- und Analyseverfahren (modifiziert nach Rüschoff et al. 2009).
***Kursiv* geschriebene Nachweismethoden sind von der FDA zugelassen.**

Generell wird bei jedem invasiven Mammakarzinom der HER2-Status bestimmt, wobei es, entsprechend der aktuellen Leitlinien (Kreienberg et al. 2012; Wolff et al. 2007), dem Pathologen frei steht, ob er zur initialen Diagnostik die Immunhistochemie einsetzt oder ein in-situ-Hybridisierungsverfahren (FISH, CISH, SISH) durchführt (Burandt & Sauter 2010; Rüschoff et al. 2009). Die Untersuchungen erfolgen an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe, das entweder stanzbiotisch oder besser durch Resektion gewonnen wird. Desweiteren wird empfohlen, standardisierte Testkits zu verwenden, um die Validität und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (Carney et al. 2007; Kreienberg et al. 2012). Einige dieser Testkits sind ebenfalls in Tabelle 1 dargestellt.

Der aktuelle Testalgorithmus zur HER2-Bestimmung ist in Abb. 1 dargestellt und wird nachfolgend näher erläutert.

Die Immunhistochemie beruht wie bereits erwähnt auf dem Nachweis des auf der Zellmembran lokalisierten Rezeptors. Dabei werden spezifische Antikörper gegen

bestimmte Bestandteile von HER2 (p185) verwendet. Unter Anwendung weiterer Anti-Antikörper, die wiederum mit Enzymen oder Farbstoffen gekoppelt sind, wird nachfolgend eine Färbereaktion erzeugt. Die meisten Testkits zum immunhistochemischen Nachweis des HER2-Rezeptors beruhen auf der sogenannten Avidin-Biotin- bzw. Streptavidin-Biotin-Methode, welche die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin für Biotin zur Komplexbildung ausnutzt. Diese Komplexe entstehen entweder durch Bindung von enzymmarkierten Avidin-Biotin-Einheiten (ABC-Methode) oder durch Kopplung von enzymmarkiertem Avidin an biotinylierte Sekundärantikörper (labelled avidin biotin technique, LAB), welche sich im Vorfeld an den eigentlichen HER2-Antikörper angelagert haben (Kumar et al. 2009).

Im Anschluss erfolgt die lichtmikroskopische, visuelle Beurteilung der Färbereaktion durch den Pathologen anhand des sogenannten DAKO-Scores. Dieser umfasst vier Beurteilungskategorien von 0 bis 3+, die auch dem Testalgorithmus der Abb. 1 zu entnehmen sind.

Ein Score von 3+, der einem positiven HER2-Status beziehungsweise einer Überexpression von HER2 entspricht, liegt vor, wenn bei mehr als 30% der invasiven Tumorzellen eine intensive, uniforme und vollständig zirkuläre Färbung der Zellmembran nachweisbar ist.

Rund 15-20% aller invasiven Mammakarzinome weisen immunhistochemisch einen grenzwertigen Befund auf und werden als 2+ klassifiziert (Rüschoff et al. 2009). Dieser Score ist definiert als starke zirkuläre membranäre Markierung von weniger als 30% der invasiven Tumorzellen oder als zirkuläre Färbung der Zellmembran von geringer bis mittelgradiger Intensität bei mehr als 10% der invasiven Tumorzellen. In einem solchen Fall sollte unbedingt eine in-situ-Hybridisierung angeschlossen werden. Etwa 30% dieser Fälle werden nachträglich durch die FISH als HER2-positiv identifiziert (Rüschoff et al. 2009).

Liegen eine kaum sichtbare Färbereaktion bei weniger als 10% der invasiven Tumorzellen oder eine schwache, inkomplette Färbung der Zellmembran bei mehr als 10% der invasiven Tumorzellen vor, entspricht dies einem Score von 0 beziehungsweise 1+. Diese Patienten gelten als HER2-negativ und gelten somit nicht als für eine Anti-HER2-Therapie geeignet.

Bei den in-situ-Hybridisierungsverfahren werden zum Nachweis eines bestimmten Gens spezifische DNA-Sonden eingesetzt und deren Signale im Anschluss entweder mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (FISH), oder mit einem Lichtmikroskop (z.B. CISH) ausgezählt. Dabei werden Testkits verwendet, die sowohl nur Sonden für das HER2-Gen beinhalten, als auch solche, die zusätzlich eine Sonde für die Centromerregion von Chromosom 17 (sogenannte CEP17 Sonden) verwenden. Letztere sollten bevorzugt eingesetzt werden, da sie beispielsweise helfen, Poly- und Monosomien zu identifizieren (Rüschoff et al. 2009).

Die Auswertung erfolgt durch die Auszählung der HER2- und gegebenenfalls Chromosom 17-spezifischen Signale von mindestens 20 Tumorzellkernen an wenigstens zwei Invasionsfronten.

Ein positiver HER2-Status liegt vor, wenn mehr als sechs HER2-Signale bei der Mehrzahl der Tumorzellen (>50%) detektierbar sind. Bei Verwendung von Testkits mit zusätzlicher CEP17 Sonde werden hingegen die HER2- und CEP17- Signale von 20 Tumorzellkernen jeweils addiert. Anschließend wird die sogenannte FISH-Ratio gebildet, indem ein Quotient aus den Summen der HER2-Signale und der Chromosom 17-spezifischen Signale gebildet wird. Ein Verhältnis $>2,2$ gilt als eindeutige Amplifikation, welche einem positiven HER2-Status entspricht.

Ein unklarer Befund liegt vor, wenn die absolute Genkopienzahl zwischen 4 und 6 bei mehr als der Hälfte der Tumorzellen liegt oder das Verhältnis HER2 zu CEP17 zwischen 1,8 und 2,2 beträgt. Bei einem solchen Grenzwertbefund müssen weitere Untersuchungen angeschlossen werden. Beispielsweise können eine Auszählung weiterer Tumorzellen aus verschiedenen Arealen, eine Befundung durch einen Zweitpathologen oder eine Wiederholung des ISH-Verfahrens erfolgen. Nicht zuletzt wird, falls noch nicht durchgeführt, eine Immunhistochemie zur Überprüfung angeschlossen (Kreienberg et al. 2012; Rüschoff et al. 2009).

Für eine endgültige Bewertung unklarer Befunde wurden „cut-off“-Werte definiert. Der „cut-off“ für die FISH-Ratio wurde bei $\geq 2,0$ angesetzt. Für die absolute Genkopienzahl gelten hingegen unterschiedliche Empfehlungen. Während die S3-Leitlinie den „cut-off“ bei > 5 Genkopien ansetzt, empfehlen ASCO/USCAP die Benutzung eines „cut-offs“ von > 6 Genkopien (Kreienberg et al. 2012; Rüschoff et al. 2009).

Außerdem können sogenannte Plausibilitätskriterien bei der Beurteilung unklarer Fälle herangezogen werden. Hierzu gehören die inverse Beziehung zwischen HER2- und Hormonrezeptorstatus sowie bestimmte histologische Tumorcharakteristika.

Während HER2-positive Karzinome sich durch eine schlechte Differenzierung und damit höheren histologischen Grad auszeichnen, sind (gut differenzierte) G1-Karzinome und typische medulläre Karzinome stets HER2 negativ (Jacquemier et al. 2005; Ross et al. 2009; Rüschoff et al. 2009; Vincent-Salomon et al. 2007). Auch das klassische lobuläre Karzinom ist nur selten HER2-positiv. Liegen die absolute Zahl der Genkopien durchschnittlich unter vier oder die FISH-Ratio unter dem Wert von 1,8 gilt der Tumor als HER2-negativ.

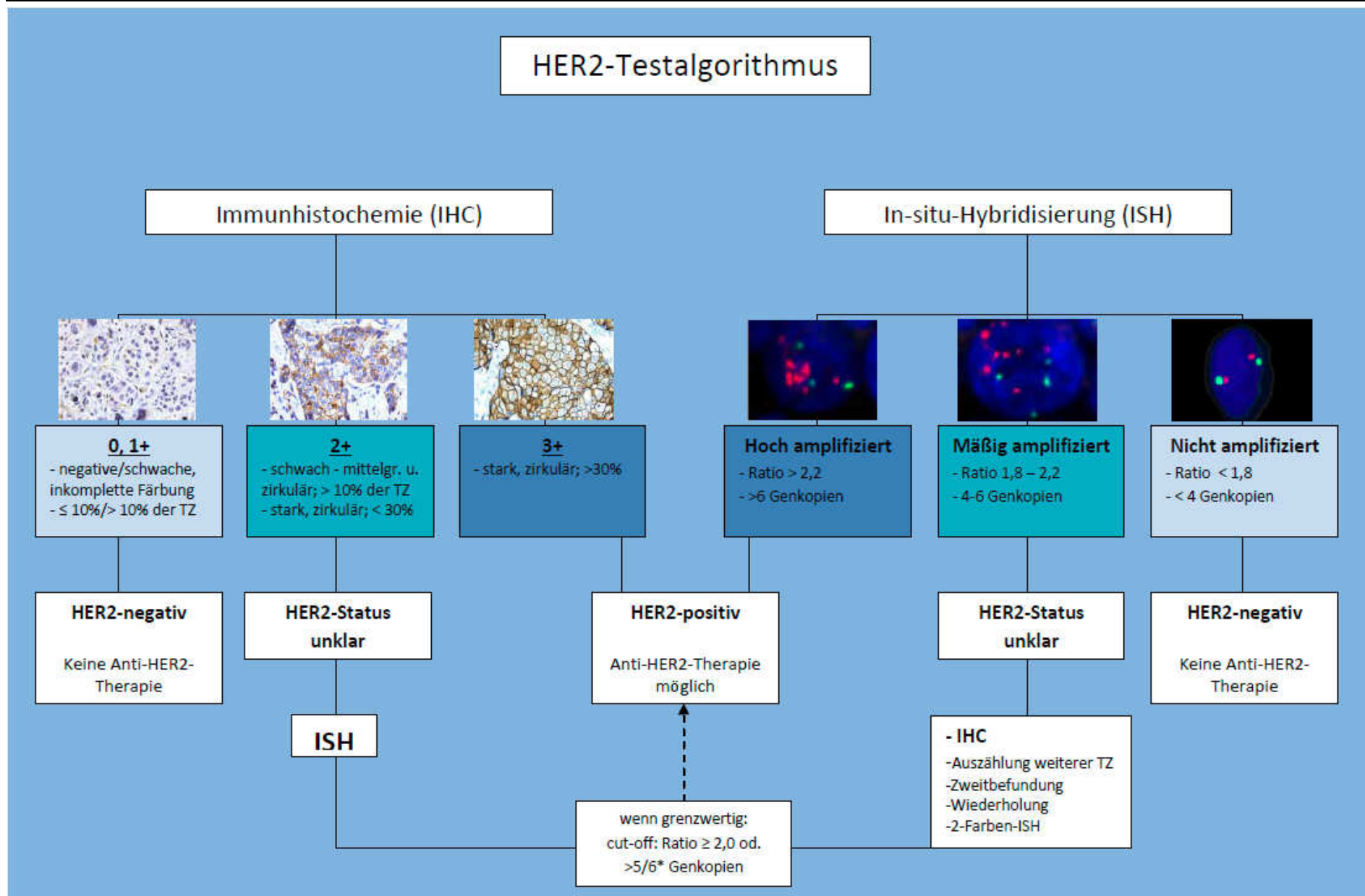


Abb. 1: Testalgorithmus zur HER2-Bestimmung (modifiziert nach Rüschoff et al. 2009, Bilder mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Rüschoff).

2.5 Verfahren zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen

Die Entstehung von Metastasen bei Brustkrebs beruht auf der Vorstellung, dass einige Tumorzellen bereits frühzeitig in der Lage sind, sich aus dem Zellverband des Primärtumors heraus zu lösen, um anschließend in den Blutkreislauf zu gelangen (Braun & Naume 2005). Dieser Prozess, der auch als Intravasation bezeichnet wird, erfolgt entweder direkt durch Eindringen der Tumorzellen in die Blutgefäße oder über lymphatische Abflusswege (Braun & Naume 2005; Pantel et al. 2004).

Aus Modellversuchen weiß man, dass rund 1×10^6 Tumorzellen pro Gramm Tumorgewebe täglich in den Blutstrom gelangen (Chang et al. 2000; Paterlini-Brechot et al. 2007). Es ist allerdings auch bekannt, dass etwa 85% der eingeschwemmten Tumorzellen innerhalb kürzester Zeit untergehen (Berezovskaya et al. 2005; Glinsky et al. 2003; Luzzi et al. 1998; Paterlini-Brechot & Benali 2007).

Deshalb gelten zirkulierende Tumorzellen im Vergleich zu den normalen Blutzellen als sehr selten. Man nimmt an, dass man unter 10^5 bis 10^7 Blutzellen eine zirkulierende Tumorzelle finden kann (Allan et al. 2010; Mostert et al. 2009; Paterlini-Brechot & Benali 2007; Sleijfer et al. 2007).

Daher wird in vielen der bisher entwickelten Methoden zunächst ein Anreicherungsschritt vorangeschaltet, um anschließend in einem zweiten Arbeitsgang die eigentlichen Tumorzellen zu identifizieren (Mavroudis 2010; Mostert et al. 2009; Pinzani et al. 2006; Wong et al. 2006).

Zur Anreicherung können einerseits morphologische Eigenschaften wie die Größe oder die Dichte von Tumorzellen genutzt werden. Andererseits werden Anreicherungstechniken wie die immunomagnetische Separation angewandt, bei der Antikörper, die mit magnetischen Partikeln gekoppelt sind, an bestimmte Zellantigene der Tumorzellen binden. Mithilfe eines Magneten ist es nachfolgend möglich, diese Zellen von anderen Blutzellen zu separieren (Mostert et al. 2009). Doch keine der Anreicherungsmethoden weist eine 100%ige Sensitivität auf, sodass davon ausgegangen werden muss, dass viele Tumorzellen durch diese Arbeitsschritte verloren gehen und somit unentdeckt bleiben.

Bei der eigentlichen Detektion von zirkulierenden Tumorzellen kann man grundsätzlich zwischen cytometrischen und molekulargenetischen Verfahren unterscheiden (Mostert et al. 2009). Cytometrische Verfahren nutzen zur genaueren

Identifikation von zirkulierenden Tumorzellen meist fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper, die entweder gegen organ-, gewebs-, tumor- oder epithelspezifische Antigene gerichtet sind (Allan & Keeney 2010). Als gewebs- oder tumorassoziierte Marker beim Mammakarzinom wurden Mammaglobin, HER2/neu und Mucin 1 beschrieben (Hayes et al. 2008; Sleijfer et al. 2007; Xi et al. 2007). Ein wichtiges epithelspezifisches Antigen, neben den Cytokeratinen, ist EpCAM (Allan & Keeney 2010). Außerdem nutzen viele Verfahren zur weiteren Diskrimination zwischen epithelialen Tumorzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems Antikörper gegen das leukocytenspezifische Oberflächenmolekül CD45 (Allan & Keeney 2010; Goodale et al. 2009a; Goodale et al. 2009b; Mostert et al. 2009).

Der Vorteil dieser cytometrischen Verfahren besteht in der Möglichkeit der weiteren morphologischen Begutachtung und molekularen Phänotypisierung der Tumorzellen, die zusätzliche Einblicke in den Metastasierungsprozess und die Tumorbilogie liefern könnte (Mostert et al. 2009).

Bei den Nukleinsäuren-basierten Verfahren zur Detektion zirkulierender Tumorzellen ist der mRNA-Nachweis verschiedener epithel- oder tumorspezifischer Marker durch RT-PCR (reverse Transkriptase-Polymerase- Kettenreaktion) eine weit verbreitete Methode (Mostert et al. 2009).

Es gibt bisher jedoch keinen Marker, mit dem allein eine ausreichend hohe Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann. Deshalb nutzen die meisten Verfahren mehrere Marker gleichzeitig.

Stellvertretend für eine Reihe von Verfahren werden nachfolgend zwei Methoden näher erläutert.

Die sogenannte CellSearch®-Methode ist bisher das einzige Verfahren, das von der FDA zur Detektion von CTC zugelassen wurde (Allard et al. 2004; Mavroudis 2010; Oakman et al. 2010; Riethdorf et al. 2007). Bei diesem semi-automatisierten Verfahren erfolgt die Anreicherung durch mit Eisenpartikeln gekoppelte Antikörper gegen EpCAM. Anschließend werden die angereicherten Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CK und DAPI (DNA-/Zellkern-Farbstoff) gefärbt, während hämatopoetische Zellen, insbesondere Leukocyten, mit Anti-CD45-Antikörpern gegengefärbt werden. Nachfolgend werden alle CK-positiven, DAPI-positiven und

CD45-negativen Zellen durch ein Fluoreszenzmikroskop automatisch erfasst und gezählt (Mostert et al. 2009; Oakman et al. 2010).

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte MAINTRAC®-Methode ist ein weiteres Verfahren zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen und nutzt ebenfalls fluoreszenzmarkierte Anti-EpCAM und Anti-CD45-Antikörper (Pachmann et al. 2005b). Der wesentliche Unterschied zur CellSearch-Methode liegt darin, dass im Vorfeld keine Fixierung und keine Anreicherung von Zellen stattfindet (Cristofanilli et al. 2008; Mostert et al. 2009; Pachmann et al. 2011).

Die Erythrocyten einer Blutprobe werden lediglich im Vorfeld lysiert. Außerdem werden die Proben mit 7AAD versetzt um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Die Auswertung erfolgt automatisiert durch ein Laser Scanning Cytometer (LSC®) oder durch Scan[^]R, einem Fluoreszenzmikroskop (Pachmann et al. 2011).

Allerdings weisen all diese Verfahren eine eingeschränkte Spezifität und/oder Sensitivität auf. Möglicherweise könnte mit dem parallelen Nachweis mehrerer Marker die Sensitivität und Spezifität erhöht werden (Allan & Keeney 2010).

2.6 EpCAM

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist ein Typ I –Transmembranprotein (Singlepass-Transmembranprotein) mit einem Molekulargewicht von rund 40 kDa (Baeuerle & Gires 2007; Balzar et al. 1999; Edwards et al. 1986; Trzpis et al. 2007). Das aus 314 Aminosäuren zusammengesetzte Glykoprotein nimmt eine Sonderstellung bei den Zelladhäsionsmolekülen ein, da es keinem der vier Prototypen/Hauptgruppen (Cadherine, Selektine, Integrine, Immunglobulin-CAMs) zuordenbar ist (Aplin et al. 1998; Horwitz et al. 1996; Litvinov et al. 1997; Litvinov et al. 1994; Trzpis et al. 2007). Es setzt sich aus einem extrazellulären Abschnitt, einer Transmembrandomäne und einem kurzen cytoplasmatischen Schwanz zusammen (Baeuerle & Gires 2007). Jedoch fehlen dem EpCAM die multiplen sich wiederholenden Subdomänen, die für die anderen Zelladhäsionsmoleküle charakteristisch sind (Balzar et al. 1999; Trzpis et al. 2007).

Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer Signalsequenz von 23 Aminosäuren, gefolgt von einem EGF („epidermal growth factor“)-ähnlichen Abschnitt, einer Thyroglobulin-Domäne (zweiter EGF-ähnlicher Abschnitt) und einer cysteinarmen N-

terminalen Region (Baeuerle & Gires 2007; Chong et al. 2001; Linnenbach et al. 1989). Die EGF-ähnlichen Domänen dienen einerseits der Bildung von EpCAM-Tetrameren, andererseits vermitteln sie interzelluläre Verbindungen zu anderen EpCAM-Tetrameren und sind damit auch für die (homophile) calciumunabhängige Zell-Zelladhäsion verantwortlich (Balzar et al. 2001; Trebak et al. 2001).

Die intrazelluläre Domäne besitzt zwei alpha-Aktinin bindende Stellen, die für eine Verbindung zum Aktin-Cytoskelett sorgen und damit/hiermit die Zell-Zelladhäsion stabilisieren (Balzar et al. 1998).

Dennoch ist die EpCAM vermittelte Zell-Zelladhäsion im Vergleich zu anderen Adhäsionsproteinen, wie beispielsweise den Cadherinen, relativ schwach (Balzar et al. 1999; Litvinov et al. 1994).

EpCAM wurde 1979 mithilfe des monoklonalen Antikörpers 17-1A entdeckt und zunächst als kolorektalkarzinom-spezifisches, tumorassoziertes Antigen beschrieben (Herlyn et al. 1979). Heute weiß man, dass es in nahezu allen normalen Epithelgeweben und in vielen Neoplasien epithelialen Ursprungs (Karzinomen) exprimiert wird (Osta et al. 2004). Ausnahmen bilden Plattenepithelien und bestimmte epithel-verwandte Zellen wie Keratinocyten oder Hepatocyten, in denen normalerweise kein EpCAM nachgewiesen werden kann (Osta et al. 2004; van der Gun et al. 2010; Winter et al. 2003a).

In den meisten Karzinomen wird EpCAM deutlich stärker exprimiert als in den entsprechenden Normalgeweben (Osta et al. 2004; Patriarca et al. 2012). Des Weiteren kann auch in normalerweise EpCAM-negativen Epithelien und epithel-abgeleiteten Zellen eine de novo Expression in Phasen aktiver Proliferation und im Rahmen von Dysplasien oder Metaplasien beobachtet werden. Dies stellt möglicherweise einen frühen Schritt in der malignen Transformation epithelialer Gewebe dar (Osta et al. 2004; Patriarca et al. 2012; Winter et al. 2003b).

In normalen Epithelien wird das Molekül an der basalen oder basolateralen Membran ausgebildet. In Karzinomen ist die Verteilung jedoch, abhängig vom Tumortyp, verschieden (Trzpis et al. 2007). Das, infolge einer Überexpression, veränderte Ausprägungsmuster führt meist zu einer intensiven uniformen Membranfärbung, insbesondere auch der apikalen Membran und ist häufig auch mit einer cytoplasmatischen Färbung verbunden (Patriarca et al. 2012; Trzpis et al. 2007; van der Gun et al. 2010; Winter et al. 2003b).

Die Funktionen von EpCAM scheinen vielfältig und zum Teil auch gegensätzlich zu sein.

Neuere Studien zeigen, dass EpCAM nicht nur für die Zelladhäsion wichtig ist, sondern auch bei Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist und eine Rolle bei der Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen spielt und somit einen Beitrag zur Karzinogenese und Metastasierung leisten könnte (Okegawa et al. 2004; Patriarca et al. 2012; Trzpis et al. 2007; van der Gun et al. 2010).

Während EpCAM in normalen Epithelien Zelladhäsion vermittelt, kann es in Karzinomen auch Gegensätzliches bewirken und somit das Herauslösen von Zellen aus dem Primärtumor ermöglichen (Litvinov et al. 1994; van der Gun et al. 2010; Winter et al. 2003a).

EpCAM ist beispielsweise in der Lage, die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion durch Unterbrechung der Verbindung zwischen alpha-Catenin und F-Aktin zu lösen (Litvinov et al. 1997; Osta et al. 2004; Trzpis et al. 2007; Winter et al. 2003a). Außerdem scheint eine Interaktion zwischen EpCAM und Claudin-7, einem tight junction Protein, die EpCAM-vermittelte Zelladhäsion zu behindern (van der Gun et al. 2010).

Voraussetzungen für eine Metastasierung sind aber nicht nur der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, sondern auch der Verlust der Zellpolarität, eine gesteigerte Motilität und invasives Verhalten der Tumorzellen (van der Gun et al. 2010). Es wird angenommen, dass Tumorzellen viele dieser Eigenschaften erwerben, indem sie einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser Wandlungsprozess wird auch als EMT (epithelial to mesenchymal transition) bezeichnet. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass zirkulierende Tumorzellen, infolge einer Herunterregulierung, deutlich weniger EpCAM exprimieren als Zellen des Primärtumors (Trzpis et al. 2007; van der Gun et al. 2010).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich in Tumorzellen karzinom-spezifische Komplexe aus EpCAM und anderen Zelladhäsionsmolekülen oder Membranproteinen ausbilden können, die die Entstehung von Metastasen begünstigen (Trzpis et al. 2007; van der Gun et al. 2010).

Einen weiteren Anhalt für die Bedeutung von EpCAM bei der Metastasierung liefert die Funktion der extrazellulären Thyroglobulin-Domäne, die als Cathepsin/Protease-Inhibitor wirkt. Da Tumorzellen im Rahmen des Metastasierungsprozesses häufig

selbst Cathepsine freisetzen, können sie sich mithilfe der Thyroglobulin-Domäne vor dem Selbstverdau schützen (Baeuerle & Gires 2007).

Wie bereits geschildert könnte die gesteigerte Motilität von metastasierenden Tumorzellen auf einer Herabregulation von EpCAM im Rahmen der EMT beruhen. Andererseits scheint EpCAM selbst die Zellmigration unter physiologischen Bedingungen zu fördern. Denn beispielsweise die Wanderung der Zellen von basal nach luminal in der schnell regenerierenden Darmschleimhaut, die durchaus Parallelen zum migratorischen Prozess bei der Metastasierung aufweist, ist ebenfalls von einer EpCAM-Überexpression begleitet (Trzpis et al. 2007).

Desweiteren konnte Münz et al. die Rolle von EpCAM als onkogenes Signalprotein nachweisen. Nach TNF- α -induzierter Proteolyse von EpCAM kommt es über die Intrazellulärdomäne, die dann als Transkriptionskomplex fungiert, zu einer Induktion der c-myc-Synthese, einem Protoonkogen, dessen Überexpression typisch für verschiedene Karzinomtypen ist und dessen Bedeutung in der Zellzykluskontrolle, der Wachstumsregulation und der Zelldifferenzierung liegt (Maetzel et al. 2009; Munz et al. 2009; Münz et al. 2004; van der Gun et al. 2010).

Zudem konnte anhand von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs gezeigt werden, dass mit progredienter Entartung der Zellen, ausgehend von einer Hyperplasie, über das Stadium der Dysplasie bis hin zum Karzinom, auch die EpCAM-mRNA-Expression zunahm (van der Gun et al. 2010). Dies könnte wiederum ein Hinweis auf die Beteiligung von EpCAM an der Karzinogenese sein.

All diese postulierten Funktionen von EpCAM könnten begründen, warum eine Überexpression in vielen Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (van der Gun et al. 2010).

Doch erstaunlicherweise ist eine EpCAM-Überexpression nicht in allen Karzinomen mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Sowohl beim klarzelligen Nierenzellkarzinom (van der Gun et al. 2010), als auch beim Schilddrüsenkarzinom (van der Gun et al. 2010) ist ein starker Ausprägungsgrad des Zelladhäsionsmoleküls mit einem besseren klinischen Outcome assoziiert.

Außerdem konnte für das Larynx-Ca gezeigt werden, dass nicht eine Überexpression, sondern eine geringere EpCAM-Ausprägung mit einer erhöhten Metastasierungs- und Rezidivrate sowie einem kürzeren Überleben einher ging (Balzar et al. 1999).

Diese in vielerlei Hinsicht duale Rolle von EpCAM, wie beispielsweise in Bezug auf die Zelladhäsion, könnte auf Glykosilierungsunterschiede an der Extrazellulärdomäne von EpCAM oder auf epigenetische Veränderungen zurückzuführen sein (Baeuerle & Gires 2007; Pauli et al. 2003; Trzpis et al. 2007). Außerdem wurde die Hypothese geäußert, dass die Funktion von EpCAM auch vom Mikromilieu und vom Expressionslevel abhängen könnte (Trzpis et al. 2007).

EpCAM-Expression beim Mammakarzinom:

Auch Mammakarzinome wurden auf ihre EpCAM-Expression untersucht. Osta et al. fanden eine 100 bis 1000fach höhere Expression bei primärem oder metastasiertem Brustkrebs im Vergleich zum normalen Brustgewebe (Osta et al. 2004).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine starke EpCAM-Expression sowohl bei nodal-positivem als auch beim nodal-negativen Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Schmidt et al. 2008; Spizzo et al. 2004; van der Gun et al. 2010).

Es konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen einer EpCAM-Überexpression und einem positivem Lymphknotenstatus hergestellt werden (Trzpis et al. 2007). Desweiteren fand man eine positive Korrelation zwischen der Tumorgroße und der EpCAM-Expression (Spizzo et al. 2004; van der Gun et al. 2010).

2.7 Therapie des invasiven Mammakarzinoms

Bei der Behandlung von Patientinnen mit invasivem Brustkrebs kommen wie bei vielen anderen Krebserkrankungen auch die drei Säulen Chirurgie, Strahlentherapie und Systemtherapie zum Einsatz. Letztere umfasst beim Mammakarzinom die Chemotherapie, die endokrine Therapie sowie die zielgerichteten Therapien (targeted therapies) mit Antikörpern und Tyrosinkinaseinhibitoren (Kreienberg et al. 2012; Preiß et al. 2012; Wörmann et al. 2011). Wann und in welchem Umfang diese Optionen zum Einsatz kommen, hängt von vielen klinischen, pathologischen und tumorbiologischen Eigenschaften ab. Grundsätzlich kann man lokal begrenzte Stadien von lokal fortgeschrittenen Stadien sowie Situationen unterscheiden, in denen bereits eine Fernmetastasierung stattgefunden hat oder ein sogenanntes lokoregionales Rezidiv aufgetreten ist (Kreienberg et al. 2012; Wörmann et al. 2011).

Eine Übersicht über die einzelnen Therapieoptionen in den verschiedenen Erkrankungsstadien bietet Abbildung 2.

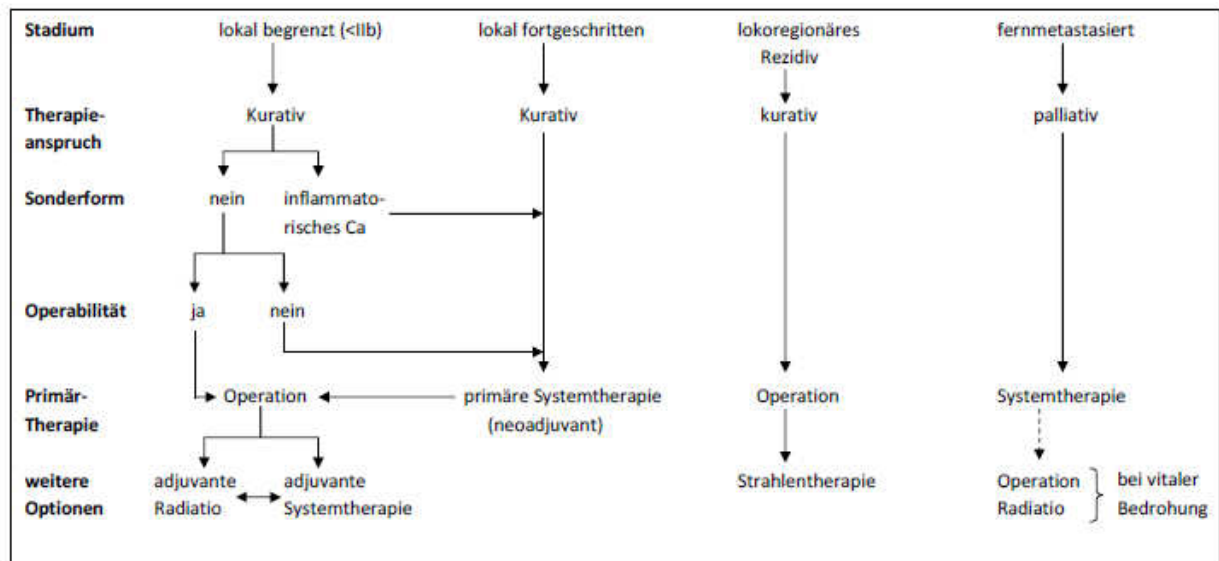


Abb. 2: Therapieoptionen beim invasiven Mammakarzinom (modifiziert nach DGHO- onkopedia Leitlinien 2010/11 (Wörmann et al. 2011)).

Hinsichtlich des operativen Vorgehens beim Mammakarzinom kann zwischen brusterhaltenden und ablativen Verfahren unterschieden werden (Kreienberg et al. 2010; Preiß et al. 2012; Sehouli 2009). Eine brusterhaltende Therapie erfordert immer eine Nachbestrahlung zur Senkung der lokoregionären Rezidivrate (Kreienberg et al. 2012). Ein heutzutage häufig angewandtes ablatives Verfahren ist die modifizierte radikale Mastektomie (Kreienberg et al. 2012). Dieses Verfahren sollte unter anderem angewandt werden bei Multizentrität des Tumors, bei inflammatorischen Mammakarzinomen (nach einer neoadjuvanten Systemtherapie), bei einem ungünstigen Tumor-Brustgrößenverhältnis, wenn eine komplette Tumorsektion im Gesunden nicht möglich erscheint sowie wenn eine Nachbestrahlung nicht möglich/kontraindiziert ist (Kreienberg et al. 2012; Preiß et al. 2012).

Die Patientinnen sollten dabei immer auf die Möglichkeit von plastisch rekonstruktiven Eingriffen hingewiesen werden (Kreienberg et al. 2012). Hinsichtlich des Gesamtüberlebens sind beide Verfahren, also die brusterhaltende Therapie mit Nachbestrahlung sowie die alleinige modifizierte radikale Mastektomie gleichwertig (Kreienberg et al. 2012).

Ein Bestandteil der Operation ist auch die Bestimmung des histologischen Nodalstatus, der (wie bereits eingangs geschildert) einer der wichtigsten

Prognosefaktoren darstellt (Kreienberg et al. 2010). Derzeitiger Standard ist die diagnostische Entfernung eines Sentinel-Lymphknotens (Kreienberg et al. 2012). Eine Axilladisektion, das heißt die Entfernung von mindestens 10 Lymphknoten aus den Level I und II, wird aktuell nur nach Mastektomie mit positivem Sentinel-Lymphknoten-Befund, nach BET mit mehr als zwei positiven Sentinel-Lymphknoten oder bei bestehenden Kontraindikationen gegen eine nachfolgende Bestrahlung angeschlossen (Bodmer et al. 2011; Goldhirsch et al. 2011; Preiß et al. 2012; Wagner et al. 2011).

Die Strahlentherapie ist der zweite wesentliche Bestandteil der Brustkrebsbehandlung und verfolgt ebenfalls das Ziel der lokalen Tumorkontrolle, sprich die Vermeidung eines lokoregionären Rezidivs (Kreienberg et al. 2012; Kreienberg et al. 2010; Preiß et al. 2012; Wörmann et al. 2011). Außerdem kann durch eine adjuvante Strahlentherapie eine Senkung der Mortalität (Verlängerung der Überlebenszeit) erreicht werden (Kreienberg et al. 2012).

Bei der Planung einer Strahlentherapie kann zwischen verschiedenen Bestrahlungsmodalitäten unterschieden werden. So kann (beispielsweise) zwischen einer Bestrahlung der Restbrust und Brustwand, einer Boost-Bestrahlung des Tumorbettes sowie einer Bestrahlung der regionalen Lymphabflussgebiete differenziert werden (Wörmann et al. 2011).

Eine Radiatio ist, wie bereits erwähnt, immer nach einer brusterhaltenden Therapie indiziert (Kreienberg et al. 2012). Auch nach Mastektomie bei mehr als 3 befallenen Lymphknoten oder bei großem Primärtumor (>5cm) oder bei nicht erreichter R0-Resektion, kann zusätzlich eine Strahlentherapie indiziert sein (Bodmer & Castiglione 2011; Preiß et al. 2012). Des Weiteren kann sie bei der Behandlung eines lokoregionären Rezidivs zum Einsatz kommen (Kreienberg et al. 2012). Nicht zuletzt stellt die Strahlentherapie auch bei der Therapie von Metastasen, beispielsweise im Skelett, eine Option dar (Preiß et al. 2012; Sehouli 2009).

Die dritte Säule, die Systemtherapie, beinhaltet, wie oben bereits erwähnt, die Chemotherapie, die endokrine Therapie und den Einsatz von Antikörpern und small molecules gegen bestimmte Strukturen. Sie kann sowohl neoadjuvant als auch adjuvant eingesetzt werden. Die Entscheidung, welche Formen der Systemtherapie angewandt werden, wird anhand von klassischen Prognose- und Prädiktionsfaktoren

sowie etablierten immunhistochemischen Markern/Parametern getroffen, (die in der Abbildung 3 dargestellt sind). Anhand dieser Faktoren kann eine Einteilung in klinisch-pathologische Subtypen erfolgen und das Ansprechen auf eine Chemo-, Hormon- oder Antikörpertherapie (und damit auch der Nutzen,) abgeschätzt werden (Goldhirsch et al. 2009; Goldhirsch et al. 2011). Die bereits erwähnten klinisch-pathologischen Subtypen korrelieren auch in hohem Maße mit der 2009, bei der Konsensuskonferenz in St. Gallen, besonders hervorgehobenen molekularbiologischen Subtypisierung anhand von Gensignaturen (Bodmer & Castiglione 2011). Die Einteilung in Patientinnen mit niedrigem, mittlerem und hohem Risiko für ein Tumorrezidiv und/ oder eine mögliche Fernmetastasierung, die noch 2007 bei der Konsensuskonferenz in St. Gallen befürwortet wurde, hat sich nicht bewährt und konnte 2009 nicht bestätigt werden (Goldhirsch et al. 2009; Kreienberg et al. 2010).

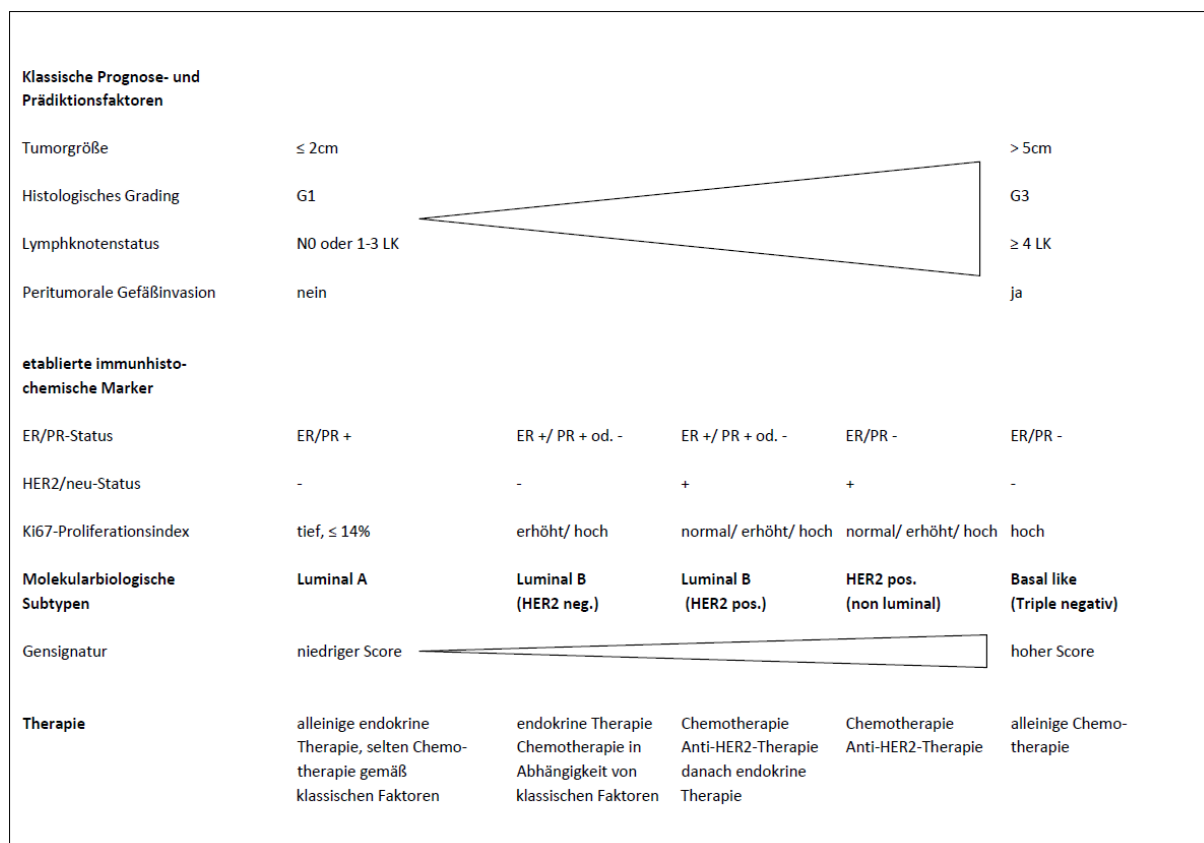


Abb. 3: Vereinfachtes Schema zur Darstellung von Konstellationen verschiedener Prognose- und Prädiktionsfaktoren und daraus resultierende mögliche Therapieoptionen (modifiziert nach Goldhirsch et al. 2009 und 2011, Bodmer et al. 2011, Kreienberg et al. 2010, Harbeck et al. 2013).

Ziel der adjuvanten Systemtherapie ist es, noch nicht nachweisbare Mikrometastasen zu eliminieren und eine Metastasierung zu vermeiden und damit eine Verbesserung des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens zu erreichen (Kreienberg et al. 2010). Denn nach wie vor gilt die Fernmetastasierung als ein wesentlicher Prognosefaktor (Stickeler et al. 2008). Vor dem Hintergrund, das Mammakarzinom als Systemerkrankung mit frühzeitiger Tumorzell dissemination zu verstehen, erlangt jedoch auch die neoadjuvante Therapie zunehmenden Stellenwert in der Behandlung (Kreienberg et al. 2010). Lange Zeit galt die präoperative Systemtherapie nur bei primär inoperablem Mammakarzinom, in lokal fortgeschrittenen Stadien oder bei einer Sonderform des Mammakarzinoms mit frühzeitiger Lymphangiosis, dem inflammatorischen Karzinom, als indiziert (siehe auch Algorithmus). Heutzutage gilt die präoperative Systemtherapie jedoch auch als Option bei allen Patientinnen, die primär operabel wären, bei denen aber nach klinischer, radiologischer und histologischer Diagnostik eine adjuvante Systemtherapie ohnehin indiziert ist (Kreienberg et al. 2010). In verschiedenen Studien, wie beispielsweise der NSABP-B-18 Studie, konnte sogar eine Gleichwertigkeit (hinsichtlich rezidivfreiem und Gesamtüberleben) beider Ansätze gezeigt werden (Kreienberg et al. 2010; Wolmark et al. 2001).

Zudem ermöglicht die neoadjuvante Therapie eine zunehmende Rate an brusterhaltenden Operationen durch Verkleinerung der Tumormasse bis hin zur pathologischen Komplettremission. Diese liegt vor, wenn nach Abschluss der neoadjuvanten Therapie keine vitalen Tumorzellen in der Brust und in der Axilla nachgewiesen werden können. Außerdem wird sie als Surrogatparameter für die Prognose diskutiert (Kreienberg et al. 2010). Ein weiterer Vorteil, den die neoadjuvante Systemtherapie in diesem Zusammenhang zu bieten scheint, ist die in-vivo-Chemosensitivitätstestung. Hierbei glaubt man das Ansprechen der Tumorzellen auf die systemische Therapie relativ frühzeitig beurteilen zu können, sodass anschließend eine schnellere Planung individueller Therapieansätze möglich werden könnte (Kaufmann et al. 2006; Kreienberg et al. 2010).

Chemotherapie

Im Rahmen der Chemotherapie werden Cytostatika aus verschiedenen Substanzklassen verwendet. Häufig verwendete Substanzgruppen sind Anthracycline wie Epirubicin oder Doxorubicin, Taxane wie Paclitaxel oder Docetaxel, das Alkylanz Cyclophosphamid sowie die Antimetabolite Methotrexat und 5-Fluorouracil. Eine adjuvante Chemotherapie wird meist als Polychemotherapie mit Kombinationen von häufig drei Cytostatika durchgeführt (Wörmann et al. 2011).

Anthracyclinhaltige Regime (AC oder FEC, FAC) gelten heutzutage unabhängig vom Nodalstatus als Standard. Bei Patientinnen mit axillärem Lymphknotenbefall, aber auch in Hochrisikosituationen beim nodal-negativen Mammakarzinom sollte zusätzlich ein Taxan angewandt werden (Kreienberg et al. 2012; Kreienberg et al. 2010). Außerdem scheint es, dass durch Verkürzung der Zyklusintervalle („dosisdichte Therapie“) und durch Erhöhung der Einzeldosen (Dosisescalation) das rezidivfreie und auch das Gesamtüberleben verbessert werden kann, dies wird aber in letzter Zeit wieder in Frage gestellt (Citron et al. 2003; Kreienberg et al. 2010; Moebus et al. 2010).

Folgende Faktoren sind analog zur Abbildung 1 hinweisend auf ein gutes Ansprechen auf eine Chemotherapie:

- triple-negatives Mammakarzinom, mit Ausnahme der Sonderformen
- schwache (<50%) oder fehlende ER-Expression
- hohes Grading (G3)
- hoher k67-Proliferationsindex
- positiver HER2-Status (Goldhirsch et al. 2011).

Alle diese Faktoren sind aber gleichzeitig auch Indikatoren für ein schlechteres rezidivfreies Überleben.

Weiterhin ist zu beachten, dass ein positiver Lymphknotenstatus nicht unbedingt als Indikation für eine Chemotherapie zu betrachten ist. Die Hochrisikosituation von mehr als drei befallenen Lymphknoten sollte allerdings zum Einsatz einer Chemotherapie führen (Bodmer & Castiglione 2011). Auch die anderen Risikofaktoren wie Alter und Tumorgroße gelten unbestritten als prognostisch relevant. Ihre prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf eine Chemotherapie scheint allerdings geringer zu sein (Bodmer & Castiglione 2011).

HER2-positive Tumoren sprechen insbesondere auf eine anthracyclinhaltige Chemotherapie sehr gut an (Pritchard et al. 2006; Ross et al. 2009). Dies könnte darauf beruhen, dass eine Amplifikation und Überexpression von HER2 häufig mit einer Koamplifikation des Topoisomerase II-alpha-Gens verbunden ist. Da der Wirkmechanismus der Anthracycline auf der Hemmung der Topoisomerase II-alpha basiert, könnte dies die Sensitivität des Tumors (gegenüber der Therapie) erklären (Ross et al. 2009). Obwohl initial in einigen Studien berichtet wurde, dass HER2-positive Tumoren auf eine taxanhaltige Chemotherapie oder auf das CMF-Schema schlechter ansprechen (Berns et al. 1995; Gai et al. 1994; Ross et al. 2009), konnten nachfolgende Untersuchungen zeigen, dass auch HER2-positive Patientinnen einen Benefit von einer CMF-Chemotherapie oder von einer zusätzlichen adjuvanten Therapie mit Paclitaxel haben (Ross et al. 2009).

Hormontherapie / endokrine Therapie

Ein vom Pathologen bestimmter positiver oder unklarer Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorstatus ist Voraussetzung für eine endokrine Therapie. Das bedeutet, dass bereits bei Nachweis von Hormonrezeptoren in 1% aller Tumorzellen eine Hormontherapie durchgeführt werden kann, da der Tumor dann als potentiell hormonsensitiv gilt/betrachtet wird (Goldhirsch et al. 2009; Goldhirsch et al. 2011; Kreienberg et al. 2012).

Für die Planung einer endokrinen Therapie ist neben Hormonrezeptorstatus auch der Menopausenstatus der Patientin von Bedeutung. der sowohl anamnestisch als auch durch die Messung der Sexualhormone FSH und Östradiol ermittelt werden kann.

Etwa 60-80% aller Frauen mit Brustkrebs kommen für eine Hormontherapie in Frage (Crohns et al. 2009; Preiß et al. 2012; Sehouli 2009; Wörmann et al. 2011).

Typische Substanzen, die im Rahmen der endokrinen Behandlung eingesetzt werden sind neben Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator, sogenannte Aromataseinhibitoren wie Anastrozol oder Letrozol und GnRH-Analoga wie Goserelin oder Leuprorelin (Preiß et al. 2012; Wörmann et al. 2011).

Targeted therapies (Anti-HER2-Therapie, Anti-Angiogenese)

In den vergangenen Jahren gewannen im Rahmen der Systemtherapie die sogenannten zielgerichteten Therapien (targeted therapies) zunehmend an Bedeutung. Unter anderem ist der HER2/neu-Rezeptor, aufgrund seiner bereits

erwähnten Funktionen und Eigenschaften, eine Zielstruktur, gegen die sich verschiedene (pharmakologisch entwickelte) Substanzen richten.

Da jedoch die Voraussetzung für eine Anti-HER2/neu-Therapie ein immunhistochemisch nachgewiesener positiver Rezeptorstatus beziehungsweise eine Amplifikation des HER2/neu-Gens ist, kann eine solche Behandlung nur bei etwa 25% aller Patientinnen durchgeführt werden.

Trastuzumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper vom IgG1-Typ (Molina et al. 2001; Pohlmann et al. 2009), der gegen die Extrazellulärdomäne IV des HER2/neu-Rezeptors gerichtet ist (Cho et al. 2003; Pohlmann et al. 2009), wurde 1998 in den USA als erste Anti-HER2/neu-Substanz bei HER2/neu-positiven Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs zugelassen (Ditsch et al. 2006; Nahta & Esteva 2006). Das Indikationsspektrum von Trastuzumab wurde 2006 aufgrund verschiedener positiver Studienergebnisse für die adjuvante Therapie früher Mammakarzinome erweitert (Ditsch et al. 2006; Piccart-Gebhart et al. 2005; Romond et al. 2005). Im Rahmen von aktuellen Studien konnte auch ein Nutzen von Trastuzumab in der neoadjuvanten Situation gezeigt werden (Goldhirsch et al. 2011). Eine offizielle Zulassung zur neoadjuvanten Therapie besteht allerdings bisher nicht. Die genaue Wirkungsweise von Trastuzumab ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Allerdings scheinen mehrere Mechanismen für die antitumorale Wirkung verantwortlich zu sein (Molina et al. 2001; Pohlmann et al. 2009; Sliwkowski et al. 1999). Dabei vermitteln sowohl das antigenbindende Fragment (Fab) des Antiköpers als auch sein kristallisierbarer Abschnitt (Fc) verschiedene Wirkmechanismen und sind für die meisten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Trastuzumab verantwortlich (Barok et al. 2007; Baselga et al. 2001; Molina et al. 2001; Musolino et al. 2008; Pohlmann et al. 2009; Yakes et al. 2002).

In der Literatur wird unter anderem eine Trastuzumab-induzierte Hemmung des Zellzyklus in der G1-Phase beschrieben. Dieser cytostatische Effekt wird wiederum über die Hochregulation von p27, einem Hemmer der cyclin-abhängigen Kinase, vermittelt (Molina et al. 2001; Sliwkowski et al. 1999; Valabrega et al. 2007).

Als ein weiterer wesentlicher Wirkmechanismus von Trastuzumab gilt die Inhibition des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase Signaltransduktionsweges, der bei positivem HER2/neu-Status eine erhöhte Aktivität aufweist (Delord et al. 2005; Nagata et al.

2004; Valabrega et al. 2007). Wie es im Detail zur Hemmung des Signalweges kommt, ist bisher allerdings noch nicht bekannt.

Gegensätzliche Ergebnisse liegen zu der Hypothese vor, dass es infolge der Therapie zu einer Herabregulation von HER2/neu-Rezeptoren durch eine gesteigerte Rezeptorendocytose mit nachfolgendem Abbau kommen soll (Molina et al. 2001; Pohlmann et al. 2009; Valabrega et al. 2007).

Auch die Blockade der so bedeutenden Heterodimerbildung mit dem HER2/neu-Rezeptor wird als möglicher Wirkungsmechanismus beschrieben (Hudis 2007). Hierdurch können eine Vielzahl von den bereits erwähnten Folgeprozessen unterdrückt werden. Dabei wird insbesondere die Interaktion zwischen dem EGF-Rezeptor und HER2/neu durch Trastuzumab direkt unterbunden (Pohlmann et al. 2009), während die Bildung des vor allem für die Zellproliferation wichtigen Heterodimers aus HER2 und HER3 (Lee-Hoeflich et al. 2008) nicht direkt verhindert wird und somit Trastuzumab nur indirekt über die Blockade nachfolgenden Signalwege seine Wirkung entfalten kann (Junttila et al. 2009; Yakes et al. 2002).

In einigen Tiermodellen konnte außerdem eine gesteigerte antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC) gegen HER2/neu-überexprimierende Tumorzellen nachgewiesen werden (Molina et al. 2001; Pohlmann et al. 2009; Valabrega et al. 2007).

Auch das bereits erwähnte Shedding, also die proteolytische Abspaltung der Extrazellulärdomäne von HER2/neu, scheint durch die Trastuzumabgabe gehemmt zu werden (Molina et al. 2001). Infolgedessen sinkende Serum-HER2-Level/Spiegel zeigen das Ansprechen auf die Therapie und sind mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert (Valabrega et al. 2007).

Die, infolge der HER2/neu-Überexpression, vermehrte VEGF-Bildung und die hierdurch stimulierte Angiogenese kann ebenfalls durch die Behandlung reduziert oder sogar normalisiert werden (Hudis 2007; Molina et al. 2001; Valabrega et al. 2007).

Leider sprechen nicht alle Patientinnen, die einen positiven HER2/neu-Status aufweisen, auf die Therapie mit Trastuzumab an. Einige von ihnen entwickeln nach initialem Ansprechen auf die Therapie im weiteren Verlauf eine scheinbare Resistenz gegenüber Trastuzumab und es kommt zum Progress der Erkrankung (meist innerhalb eines Jahres) (Nahta & Esteva 2006). Andere Patientinnen hingegen sprechen von Beginn an nicht auf die Therapie an. Für die Unwirksamkeit von

Trastuzumab wurden eine Reihe möglicher Ursachen identifiziert (Nahta & Esteva 2006; Pohlmann et al. 2009; Valabrega et al. 2007).

Die Aktivierung alternativer Signalwege über den IGF-1-Rezeptor, der mit HER2/neu interagiert (Nahta & Esteva 2006; Pohlmann et al. 2009), die sterische Blockade der Trastuzumabbindung durch verschiedene Moleküle (Carraway et al. 2001; Nagy et al. 2005; Nahta & Esteva 2006; Pohlmann et al. 2009) oder auch das Shedding (Nahta & Esteva 2006; Pohlmann et al. 2009; Scaltriti et al. 2007; Zabrecky et al. 1991) seien an dieser Stelle stellvertretend für eine Reihe von Resistenzmechanismen genannt.

Ein weiterer Nachteil von Trastuzumab ist die wahrscheinlich fehlende Passage der Blut-Hirn-Schranke, die dazu führt, dass 25-48% der Patientinnen, trotz einer ansonsten effektiven Therapie, ZNS-Metastasen entwickeln (Kreienberg et al. 2010). Hinsichtlich seiner Nebenwirkungen gilt Trastuzumab als relativ gut verträgliches Medikament. Eine relevante Nebenwirkung stellt allerdings die Kardiotoxizität dar, die zu einer Linksherzinsuffizienz führen kann (Slamon et al. 2001). Insbesondere bei einer parallelen Chemotherapie mit Anthracyclinen, die ebenfalls als kardiotoxisch gelten, ist das Risiko, eine Linksherzinsuffizienz zu entwickeln, besonders hoch (Hudis 2007; Kreienberg et al. 2012; Romond et al. 2005; Seidman et al. 2002). Die Trastuzumab-assoziierte Kardiotoxizität gilt allerdings als deutlich weniger schwerwiegend und reversibel im Vergleich zu Anthracyclinen (Hudis 2007; Perez et al. 2004; Seidman et al. 2002) und könnte mit der Bedeutung von HER2 bei der Embryogenese und der Herzentwicklung im Zusammenhang stehen (Garratt et al. 2003; Hudis 2007; Negro et al. 2004).

Eine weitere Substanz, die sich gegen HER2 richtet, ist der als small molecule bezeichnete Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib. Lapatinib vermittelt eine reversible duale Hemmung der Tyrosinkinaseaktivitäten von HER2 und dem EGF-Rezeptor über die Bindung an deren intrazelluläre ATP-Bindungsstellen und verhindert hierdurch die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege mit der Folge der Zellwachstumsinhibition (Dittrich et al. 2007; Pohlmann et al. 2009; Scaltriti et al. 2007).

Lapatinib ist derzeit ausschließlich Patientinnen mit metastasiertem oder fortgeschrittenem Brustkrebs vorbehalten, bei denen es unter Trastuzumab zu einem

Progress kam und wird in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Capecitabin verabreicht/angewandt (Preiß et al. 2012; Wörmann et al. 2011). Aufgrund unterschiedlicher Wirkungsweisen und Angriffspunkten am HER2-Rezeptor scheint Lapatinib zumindest teilweise in der Lage zu sein, eine Trastuzumab-Resistenz zu überwinden (Nahta & Esteva 2006; Pohlmann et al. 2009; Wagner et al. 2011).

Ein weiterer Vorteil von Lapatinib könnte die Wirkung auf ZNS-Metastasen sein. Als ein Vertreter der sogenannten small molecules scheint es, im Gegensatz zum größeren Antikörper Trastuzumab, die Blut-Hirn-Schranke passieren zu können und somit die Rate an Hirnfiliae um den Faktor 3 zu senken (Kreienberg et al. 2010; Valabrega et al. 2007; Wagner et al. 2011). In der französischen LANDSCAPE-Studie konnte außerdem eine mindestens 50%ige Volumenreduktion von bereits bestehenden Hirnmetastasen durch die Kombination von Capecitabine mit Lapatinib nachgewiesen werden (Wagner et al. 2011).

Ein neuerer monoklonaler Antikörper gegen HER2 ist Pertuzumab. Auch diese Substanz ist wie Trastuzumab gegen die Extrazellulärdomäne von HER2 gerichtet. Allerdings bindet Pertuzumab an ein anderes, nahe der Verbindungstelle der Domänen eins bis drei lokalisiertes, Epitop (Cho et al. 2003; Franklin et al. 2004). Seine Hauptfunktion besteht in der sterischen Blockade der Heterodimerbildung zwischen HER2 und den anderen Mitgliedern der HER-Familie und der damit verbundenen Hemmung von HER2/EGFR- beziehungsweise HER2/HER3-vermittelten Signaltransduktionsmechanismen (Nahta & Esteva 2006; Valabrega et al. 2007). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass Pertuzumab die Interaktion von HER2 mit dem IGF-1-Rezeptor in trastuzumabresistenten Zellen stören kann (Nahta & Esteva 2006). Allerdings zeigte die Therapie mit Pertuzumab bei Trastuzumabresistenz keine statistisch signifikanten Vorteile (Nahta & Esteva 2006; Tanner et al. 2004). Diese Tatsache könnte auf die Entwicklung von Kreuzresistenzen bei der Anti-HER2-Antikörpertherapie zurückzuführen sein (Nahta & Esteva 2006). Eine Kombination aus Trastuzumab und Pertuzumab führt bei zuvor unbehandelten Brustkrebszelllinien mit HER2-Überexpression zu einer gesteigerten Apoptoserate und zu Zellwachstumsarrest (Nahta & Esteva 2006; Valabrega et al. 2007).

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden weitere Substanzen entwickelt, die sich gegen HER2 oder die nachgeschalteten Signaltransduktionsmechanismen richten.

Dazu zählen weitere Therapeutika aus der Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren, modifizierte, mit Toxinen gekoppelte Anti-HER2-Antikörper, aber auch sogenannte mTOR-Inhibitoren (Nahta & Esteva 2006; Pohlmann et al. 2009; Valabrega et al. 2007).

Auch Inhibitoren gegen den IGF-1-Rezeptor, der eine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegen Trastuzumab spielen könnte (Nahta & Esteva 2006), wurden entwickelt und konnten in präklinischen Versuchen an trastuzumabresistenten Zellen eine Steigerung der Apoptoseraten bewirken (Camirand et al. 2002; Nahta & Esteva 2006).

Einen weiteren therapeutischen Angriffspunkt stellt die Tumorneoangiogenese dar. Wie bereits dargestellt, kann Trastuzumab, die, infolge einer HER2-Überexpression, gesteigerte Produktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) verringern (Hudis 2007; Molina et al. 2001; Valabrega et al. 2007). Doch auch bei HER2-negativen Patientinnen findet eine Neubildung von tumorversorgenden Gefäßen statt. In dieser Situation kann auf einen weiteren humanisierten monoklonalen Antikörper zurückgegriffen werden, der direkt gegen den Liganden VEGF-A gerichtet ist und erstmals beim metastasierten kolorektalen Karzinom eingesetzt wurde. In Kombination mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel wurde (von der EMA) 2007 die Zulassung zur first-line-Therapie des HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinoms erteilt (Dittrich & Steiger 2007; Preiß et al. 2012; Wörmann et al. 2011).

3 Ziele der Arbeit

Aus zahlreichen Untersuchungen und Studien ist bekannt, dass sich der HER2-Status des Primärtumors von dem seiner Metastasen unterscheiden kann. Gleiches konnte auch bei Vergleichen zwischen dem Primärtumor und disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sowie zwischen Primärtumor und zirkulierenden Tumorzellen gezeigt werden (Meng et al. 2004; Oakman et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit sollte mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an CETC die Kernfrage untersucht werden, ob und wieviele zirkulierende Tumorzellen mit einer Amplifikation des HER2-Gens im Blut von Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor zu finden sind. Parallel erfolgte die routinemäßige Bestimmung der CETC-Zahl mittels Scan[^]R basierend auf der MAINTRAC®-Methode. Es wurden sowohl Einzelmessungen als auch Verlaufsmessungen durchgeführt. Anhand dieser sollten folgende Sachverhalte/ Fragestellungen untersucht und beantwortet werden:

- (1) Findet man im Blut von Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor CETC mit Amplifikation des HER2-Gens?
- (2) Besteht ein Zusammenhang zwischen der CETC-Zahl und dem ermittelten Amplifikationsstatus?
- (3) Bei wie vielen Patientinnen findet man HER2-positive CETC und wieviele Patientinnen sind (danach) entsprechend der Grenzwertdefinition als HER2-positiv einzustufen?
- (4) Besteht ein Zusammenhang zwischen dem vom Pathologen am Gewebe ermittelten HER2-Status (HER2: 0, 1+, 2+ (FISH negativ)) und dem Amplifikationsstatus der CETC?
- (5) Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis amplifizierter Zellen und dem Metastasierungsstadium?
- (6) Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Östrogenrezeptorstatus und dem Nachweis HER2-amplifizierter Zellen?
- (7) Korreliert der histologische Tumorgrad mit dem HER-Status der CETC?
- (8) Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Anteil amplifizierter Zellen und der gemessenen CETC-Zahl bei wiederholten Messungen/in Verlaufsmessungen (mind. 2 Messungen)?
- (9) Ändert sich der Amplifikationsgrad der CETC im Krankheitsverlauf bzw. unter bestimmten Therapien?

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von insgesamt 69 Patientinnen der Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit der gesicherten Diagnose eines invasiven Mammakarzinoms untersucht.

Das mittlere Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose betrug 56,2 Jahre (Median=59 Jahre), wobei 72,5 % der Patientinnen älter als 50 Jahre waren.

Es fand eine Vorselektion des Patientengutes hinsichtlich des HER2-Status` des Primärtumors statt, sodass ausschließlich Patientinnen mit HER2-negativem Primarius eingeschlossen wurden. Die Bestimmung des HER2-Status sowie aller weiteren tumorbiologischen und histologischen Faktoren erfolgte durch das Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Eine detaillierte Aufstellung des Patientenkollektivs findet sich im ersten Teil des Ergebniskapitels.

Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von August 2010 bis Februar 2011. In dieser Zeit wurden im Rahmen einer bereits laufenden Studie zur Quantifizierung zirkulierender epithelialer Tumorzellen mittels Scan[^]R bei Brustkrebspatientinnen an 160 Blutproben die Zahl der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen bestimmt. Parallel dazu wurden die detektierten CETC mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf eine Amplifikation des HER2-Gens untersucht.

Dabei wurden sowohl Einzelanalysen, als auch Verlaufsmessungen durchgeführt. Die Zahl der HER2-FISH-Analysen pro Patient variierte somit zwischen einer und maximal sechs Messungen. Bei Mehrfachanalysen betrug der kürzeste Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen eine Woche und der längste 147 Tage.

Die Patientinnen wurden entsprechend der Vorschriften der Ethikkommission im Vorfeld über den Sinn und Zweck der Untersuchung aufgeklärt und ihre Zustimmung wurde eingeholt. Die Genehmigung der Ethikkommission liegt vor. Die Patientendaten wurden mit dem Einverständnis der Patientinnen, unter Beachtung des Datenschutzgesetzes und unter Wahrung der Schweigepflicht verarbeitet.

4.2 Materialien und Reagenzien

4.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Material	Hersteller /Herstellung
20x SSC-Lösung	66g - 20xSSC 200ml - Aqua dest. mit HCL auf pH 5,3 einstellen mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 250ml auffüllen
70% Formamid	24,5 ml - Formamid 99% 3,5 ml - 20x SSC-Lösung 7 ml - Aqua dest.
0,4 % Paraformaldehyd	2g Paraformaldehyd (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland) 500ml PBS
Proteinase K	Endoproteinase K von Tritirachium album SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland 50µg Proteinase K auf 3,33 ml PE-Puffer
Posthybridisierungs-Waschpuffer	100ml - 20x SSC (pH 5,3) 847ml - Aqua dest. 3ml - NP-40 mit NaOH auf pH 7,0-7,5 einstellen mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 1000ml auffüllen
Ethanolreihe (70%, 85%, 96%)	Ethanol 96% und Aqua dest.
Erythrocytenlysepuffer (EL-Puffer)	Qiagen 900ml einfaches, endionisiertes Wasser mit 100ml EL-Puffer (EDTA 0,179g / NH ₄ Cl 41,5g / KHCO ₃ 5,0g / einfaches endionisiertes H ₂ O auf 500ml)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid, SIGMA-ALDRICH, CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
PE-Puffer	PBS + 50ml 1M EDTA (+ 2mM EDTA)

PBS	Phosphate Buffered Saline, GIBCO Invitrogen™, Darmstadt, Deutschland
BSA 4% und BSA 10%	Rinderserumalbumin in PE, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Formalin 10%	neutral gepuffert, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti - CD326 (EpCAM)-FITC, (= HEA-FITC)	HEA, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland, monoklonaler (Maus-)Antikörper gegen das humane epitheliale Antigen EpCAM, konjugiert mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)
7AAD (Fluoreszenzfarbstoff)	7- Aminoactinomycin D, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland, interkaliert mit der DNA von Zellen mit erhöhter Membranpermeabilität

Tab. 2: Verwendete Puffer und Lösungen.

4.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Kit (FISH-Kit)

PATH VYSION™ HER-2 DNA-Sonden-Kit	
LSI Her2/neu SpectrumOrange DNA-Sonde (geringe Kopienzahl E.coli-Vektor) CEP 17 SpectrumGreen DNA-Sonde (E.coli-Plasmid)	<ul style="list-style-type: none"> - SpectrumOrange fluoreszenzträgermarkierte DNA-Sonde für den Her2/neu-Genlocus - 190kb groß - SpectrumGreen fluoreszenzträgermarkierte alpha-Satellit-DNA-Sonde für die Centromerregion von Chromosom 17 - 5,4kb groß - blockierende DNA - vordenaturiert in Hybridisierungspuffer
DAPI-Gegenfärbung	<ul style="list-style-type: none"> - Zellkernfärbung, interkaliert mit DNA - 1000ng/ml 4',6-Diamidino-2-Phenylindol - Phenyldiamin-Dihydrochlorid

	<ul style="list-style-type: none"> - Glycerin - Puffer
NP-40	- Nonylphenyl-polyethylenglykol-40
20x SSC-Salze	- Natriumchlorid und Natriumcitrat

Tab. 3: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Kit (FISH-Kit).

4.2.3 Labormaterial und Labortechnik

Zentrifuge „Megafuge 2.0R“	Heraeus Instruments®, Hanau, Deutschland
Objektträger	Polysine® Slides, Menzel GmbH u. Co KG, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser rund (12 mm)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe Deutschland
Deckgläser (18x18 mm)	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Wasserbad GFL®1083	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Pipetten 5µl, 10µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
3ml Pasteurpipetten, unsteril	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand GmbH und Co. KG, Werheim, Deutschland
2ml Reagiergefäße, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
15ml Falcons	Greiner bio-one Cellstart, Frickenhausen, Deutschland
Kühlschrank	
Brutschrank	Heraeus-electronic® Sepatech, Osterode, Deutschland
Fettstift (Liquid Blocker)	SCI Science Services, München, Deutschland
Kleber (FixoGum)	Marabuwerke GmbH & Co. KG, Tramm, Deutschland
Immersionsöl (S18N)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Hybridisierungskammer (GATC-Böxle)	GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland
Imaging Plate = Wellplatte	Zell-kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, Deutschland, besteht aus 96 Wells (Untersuchungskammern)

Tab. 4: Labormaterial und Labortechnik.

4.2.4 Optische Geräte

Floureszenzmikroskop 10.022 Axioplan 2 imaging	Zeiss®, Jena, Deutschland
100er Ölimmersionsobjektiv	
Filtersätze Einfachbandpass-Filter Orange (CY 3) Einfachbandpass-Filter DAPI Einfachbandpass-Filter Green (FITC)	Centromer des Chromosoms 17 Zellkern HER2/neu-Genlokus
AxioCam HRc	Zeiss®, Jena, Deutschland
Scan ^ R Olympus IX81 ZDC	Olympus Deutschland GmbH Hamburg, Deutschland; Scan ^ R ist eine modulare, Mikroskop-basierte Imaging-Plattform, die speziell für vollautomatische Bilderfassungen und Datenanalysen biologischer Proben entwickelt wurde

Tab. 5: Optische Geräte.

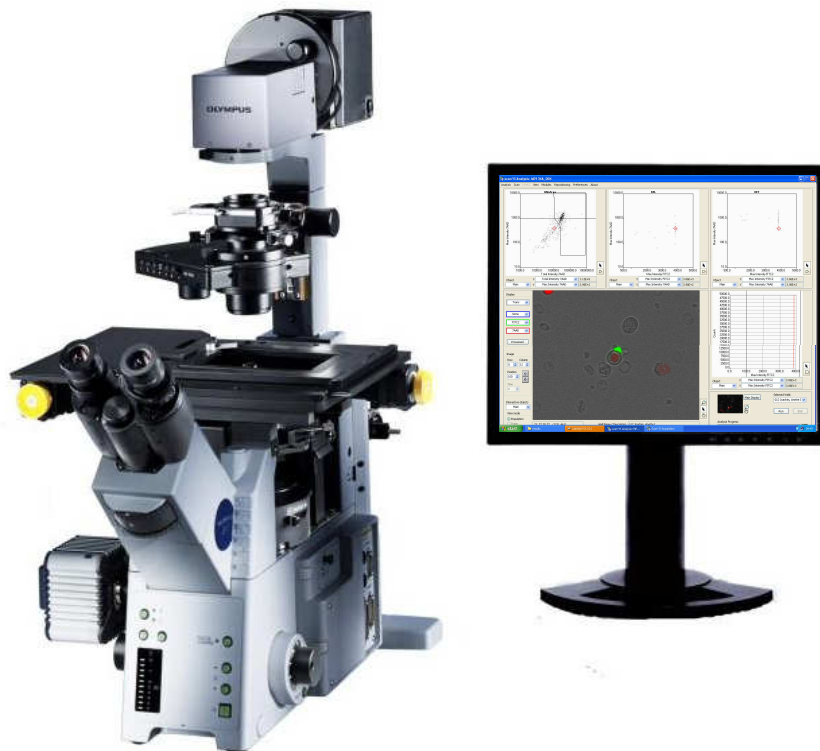


Abb. 4: Scan^R Olympus IX81 ZDC.



Abb. 5: Fluoreszenzmikroskop „Axioplan 2 imaging“ mit „AxioCam“.

4.2.5 Mess- und Auswertungs-Software

Scan^R-Software: Analysis und Acquisition

FISH-Foto-Software: AxioVision

4.3 Methoden

Der Methodenteil beinhaltet zwei verschiedene Messungen. Zum Einen wird in der Scan^R-Routinemessung die Zahl der lebenden CETC's im peripher-venösen Blut ermittelt, zum Anderen werden die CETC's hinsichtlich der Amplifikation des HER2-Gens mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht.

4.3.1 Scan^R-Routinemessung

4.3.1.1 Das Prinzip der Scan^R-Messung (MAINTRAC®-Methode)

Ein wesentlicher Unterschied zu vielen anderen Messverfahren besteht darin, dass die MAINTRAC-Methode auf eine Anreicherung von CETC verzichtet, sodass keine Isolation der vermeintlichen Tumorzellen von den weißen Blutzellen erfolgt. Lediglich die Erythrocyten werden im Vorfeld lysiert.

Durch Zugabe von Anti-CD326 (EpCAM)-FITC-Antikörpern, die gegen das humane epitheliale Antigen gerichtet sind, findet auf Zellen epithelialen Ursprungs in Abhängigkeit vom Expressionsgrad eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt. Durch Zugabe von BSA10% soll die Bindung des Antikörpers an überschüssige unspezifische Epitope verhindert und somit die Bindungsspezifität verbessert werden.

Die MAINTRAC-Methode nutzt außerdem den Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Da die Zellmembran avitaler Zellen ihre natürliche Barrierefunktion verloren hat, ist es dem Farbstoff möglich bis in den Zellkern zu gelangen und dort mit der DNA zu interkalieren. Allerdings diffundiert der Farbstoff in geringem Maße auch in lebende Zellen. Um dies weitestgehend zu reduzieren erfolgt nach der Anfärbung eine Fixation der Zellen mittels Formalin 10%.

4.3.1.2 Aufbereitung der Blutproben

Ziel der Probenaufbereitung war es, möglichst schonend, ein erythrocytenarmes Zellpellett zu erhalten.

Wir nutzen für unsere Untersuchung venöses Blut, welches in EDTA-Röhrchen zwei Tage zuvor von den Patientinnen abgenommen und bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde. Zunächst werden die Erythrocyten von einem Milliliter (1ml) der Probe mittels sieben Milliliter (7ml) Erythrocytenlysepuffer für zehn Minuten lysiert. Im Anschluss wird die Lösung für zehn Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dadurch setzt sich ein Zellpellet ab. Der Überstand wird anschließend verworfen und das Zellpellet mit 500µl PE-Puffer resuspendiert. Nach dem Vorlegen von 20µl Mastermix (120µl EpCAM-FITC, 100µl 10% BSA, 20µl 7AAD und 760µl

PBS-EDTA) in ein 2ml Reagiergefäß werden ebenfalls 20µl der Zellsuspension hinzu pipettiert. Im Anschluss muss die Suspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren, bevor 160µl PBS-EDTA zugegeben werden können. Nachdem jeweils 75µl 10%iges Formalin und PE-Puffer in ein Well der Imaging-Platte vorgelegt wurden, werden 20µl der gelabelten Probe dazu pipettiert und das Ganze gut aufgemischt. Da die Zellen, um sich absetzen zu können, eine 60minütige Inkubationszeit benötigen, werden sie für diese Zeit im Dunkeln aufbewahrt. Erst danach wird die Scan^R-Messung gestartet.

Pro Patient werden auf diese Weise jeweils zwei Probenpräparationen vorbereitet, sodass eine (voneinander) unabhängige Doppelbestimmung durchgeführt werden kann.

4.3.1.3 Probenanalyse – Messung und Auswertung

Die Detektion der suspekten Tumorzellen erfolgt zunächst vollautomatisch mit dem Scan^R-Fluoreszenzmikroskop, indem alle Zellen, die eine bestimmte Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe (FITC und 7-AAD) aufweisen, registriert und bildlich erfasst werden. Außerdem steht mit dem Aquisition-Programm eine entsprechende Software zur Einstellung der Standardmessparameter zur Verfügung. Mit dem Analysis-Programm ist eine anschließende visuelle Verifikation der als Tumorzellen erkannten Objekte möglich.

Alle Zellen, bei denen die mit FITC konjugierten Anti-EpCAM-Antikörper zu einem grün fluoreszierenden Käppchen (Cap) auf der Zelloberfläche oder zu einer starken homogenen Färbung führen, gelten als EpCAM-positiv.

Zudem ermöglicht die Analysis-Software die Begutachtung der Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität. Dabei wird, in Abhängigkeit von der Signalstärke des Fluoreszenzfarbstoffes 7-AAD, zwischen „lebend“ (schwach rot), „tot“ (stark rot) und „nicht entscheidbar“ (Artefakt) klassifiziert.

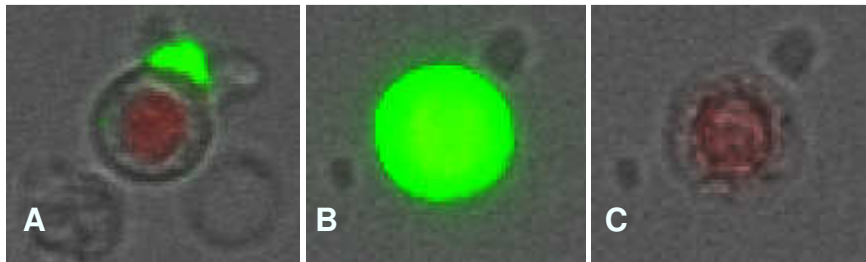


Abb. 6: Darstellung von vitalen zirkulierenden epithelialen Zellen im Scan^R-Mikroskop. (A) Zelle mit einem charakteristischen, grün fluoreszierenden EpCAM-FITC- Käppchen auf der Zelloberfläche als Zeichen epithelialer Herkunft. (B und C) Ein- und dieselbe Zelle mit und ohne Darstellung der EpCAM-FITC-Färbung. Starke membranäre Färbung weist ebenfalls auf die Expression von EpCAM hin. Beide Zellen können als lebend eingestuft werden, da der rot fluoreszierende Avitalitätsmarker 7-AAD nur zu einer schwachen Zellkernfärbung (A und C) führt. Dies spricht für die erhaltene Integrität der Zellmembran und des Zellkerns.

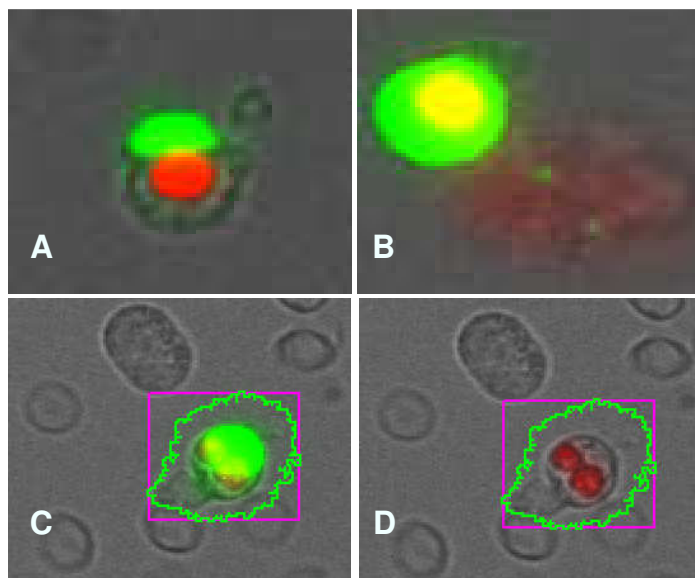


Abb. 7: Darstellung avitaler epithelialer Zellen im Scan^R-Mikroskop. (A) Zelle mit typischem EpCAM-FITC-Käppchen. Der stark rot gefärbte und damit 7-AAD-positive Zellkern weist auf eine erhöhte Permeabilität hin, sodass die Zelle als tot eingestuft wird. (B) Stark grün durchgefärbte Zelle mit Überlagerung zur intensiv roten Kernfärbung. (C und D) Ein- und dieselbe Zelle mit und ohne Darstellung der EpCAM-FITC- Fluoreszenz. In (D) sind zwei intensiv rot gefärbte Zellkerne sichtbar.

4.3.2 HER2/neu Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an CETC

4.2.2.1 Das Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

In-situ-Hybridisierungsverfahren nutzen die Eigenschaft von einsträngigen, markierten Nukleinsäuresonden aus, mit spezifischen komplementären Nukleinsäuresequenzen eine Bindung einzugehen. Voraussetzung dafür ist, dass der DNA-Doppelstrang im Vorfeld durch Denaturierung in Einzelstränge „gespalten“ wird. Erst hierdurch erhält die Sonde Zugang zur Ziel-DNA und kann mit ihr hybridisieren, sodass ein wiederum ein doppelsträngiger DNA-Abschnitt entsteht.

Ein häufig genutztes ISH-Verfahren ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Hierbei werden DNA-Sonden entweder direkt, dass heißt durch Einbau markierter Nukleotide, oder indirekt, über Antikörper, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach entsprechender Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe emittieren diese energiearme, langwellige Strahlung, welche unter einem Fluoreszenzmikroskop mit verschiedenen Exzitations- und Emmissionsfiltern sichtbar gemacht wird. Die gleichzeitige Verwendung von mehreren Sonden, die komplementär zu unterschiedlichen DNA-Abschnitten sind und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind, ermöglicht eine Mehrfachanalyse zur Detektion unterschiedlicher Gene oder Genabschnitte.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete (doppeltmarkierte) PATHVYSION™ HER2-DNA-Sondenkit beinhaltet sowohl eine locus-spezifische, 190kb SpectrumOrange direkt markierte Sonde zur Identifikation der HER2/neu-Gene (17q11.2-q12) als auch eine 5,4kb SpectrumGreen direkt markierte Centromer-Sonde zur Bindung an repetitive alpha-Satelliten-DNA des Chromosoms 17. Außerdem ist in dem Kit auch nicht-markierte, blockierende DNA enthalten, um unspezifische Sequenzen in den Zielloci zu unterdrücken. Zur Gegenfärbung der Zellkerne und damit auch zur Überprüfung der Integrität liegt dem Kit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) bei, dass ähnlich wie der Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD mit der DNA interkaliert.

Das Kit ist von der FDA zur Untersuchung an formalinfixierten, paraffineingebetteten Tumorgewebeproben zugelassen. Das Protokoll wurde jedoch für die Untersuchung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut angepasst.

Daher können sowohl numerische Aberrationen des Chromosoms 17 (Ploidiegrad), als auch eine Amplifikation des HER2/neu-Gens bestimmt werden. Außerdem kann durch die DAPI-Färbung der Zellkern identifiziert werden.

Eine FISH-Untersuchung kann, je nach Fragestellung, sowohl an Metaphase-Chromosomen, als auch an Interphasekernen und komplett entwickelten Chromatin-Fäden durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit genutzte Interphase-FISH bietet zwei Vorteile im Vergleich zur Metaphase-FISH: Zum Einen müssen die Zellen im Vorfeld nicht kultiviert werden, (und) zum Anderen besitzt dieses Verfahren eine höhere Auflösung (50kb bis 2Mb), die auch das Auffinden von Sonden in geringeren Abständen ermöglicht, sodass auch kleinere Rearrangements wie Translokationen, Inversionen oder Amplifikationen visualisierbar sind (Trask 1991; Trask 2002; van den Engh et al. 1992).

4.3.2.2 Durchführung

Tag 1: Vorbereitung der Objektträger

Die ersten Arbeitsschritte, inklusive der Resuspension des durch Zentrifugation erhaltenen Zellpellets in 500µl PE-Puffer, entsprechen dem Vorgehen unter 4.2.1.2. Danach werden 100µl dieser Lösung mit 3µl Anti-EpCAM-FITC (Anti-CD326-FITC) versetzt und für 15 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C gekühlt. Als nächstes werden 10 beziehungsweise 200 µl PE-Puffer zugegeben. 80µl dieser Zellsuspension werden nun in ein mit Fettstift begrenztes, ca. 1cm² großes Feld auf einem vorbereiteten Adhäsions-Objektträger pipettiert. Nach fünf Minuten werden zusätzlich 80µl 4%iges BSA zugegeben. Der Objektträger wird nun bis zum Trocknen der Probe, in der Regel bis zum nächsten Tag, bei Zimmertemperatur im Dunkeln gelagert, um die Fluoreszenz des Antikörpers nicht zu beeinträchtigen.

Abhängig von der im Scan^R detektierten Tumorzellzahl wird am Tag 2 entweder Objektträger I (10µl Verdünnung) oder Objektträger II (200µl Verdünnung) weiter präpariert und zur Auswertung herangezogen. Bei Blutproben mit weniger als 1500 Zellen wird Objektträger I ausgewertet, bei allen anderen (>1500 Zellen) erfolgt die Analyse von Objektträger II. Dies dient der Sicherstellung, dass die Zellen frei liegend und somit besser beurteilbar sind.

Tag 2: Inkubation mit Fluoreszenz-DNA-Sonde

Vorbehandlung des Objektträgers: Zu Beginn wird der Objektträger für zehn Minuten in Paraformaldehyd (0,4%) eingelegt. Danach werden auf das markierte Feld 30µl Proteinase K gegeben, um Histone zu entfernen. Nach vier bis fünf Minuten Inkubation erfolgt das Abspülen in Paraformaldehyd. Der Objektträger wird als nächstes für weitere fünf Minuten in Posthybridpuffer (Posthybridizationspuffer) eingelegt und danach luftgetrocknet.

Denaturierung: Ist der Objektträger vollständig getrocknet, wird er im nächsten Schritt für fünf Minuten in 70% Formamid bei 72°C eingelegt. Im Anschluss durchläuft der Objektträger für jeweils eine Minute eine aufsteigende Alkoholreihe von 70%-, 85%- und 96%igem Ethanol (Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe) und wird danach wiederum luftgetrocknet.

Hybridisierung: Als nächstes werden 3µl der handwarmen HER2/neu-CEP17-Sondenmischung in das markierte Feld gegeben und gleichmäßig verteilt. Darüber wird luftblasenfrei ein Deckglas gelegt, welches mittels Fahrradkleber (Fixogum) befestigt und luftdicht abgeschlossen wird. Der Objektträger wird über Nacht (für 14-18 h) in eine feuchte Hybridisierungskammer gelegt und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Zudem wird für den nächsten Tag Posthybridpuffer in ein 72°C warmes Wasserbad gestellt.

Tag 3: Posthybridisierungswaschvorgänge und Mikroskopie

Der Objektträger wird in einem abgedunkelten Raum aus der feuchten Kammer genommen und der Fahrradkleber vorsichtig entfernt. Dann wird der Objektträger in Posthybridpuffer (Raumtemperatur) eingelegt und das Deckglas entfernt, um ihn anschließend für zwei Minuten bei 72°C in Posthybridpuffer einzulegen. Diese Waschschrte dienen dem Entfernen überschüssiger Sonde. Nachdem der Objektträger getrocknet ist werden 10µl DAPI auf die Zellen gegeben und ein Deckglas daraufgelegt. Nun kann die Probe unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert werden.

4.3.2.3 Analyse der Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop

Der Objektträger wird mit dem Ölimmersionsobjektiv unter 100facher Vergrößerung ausgewertet. Zunächst sucht man im Grün-Filter (EpCAM-FITC) nach frei liegenden, sich nicht überlappenden, EpCAM-positiven Zellen. Dabei werden sowohl Zellen mit grünem Käppchen als auch stark grün gefärbte Zellen ohne Käppchen, analog zur Scan[^]R-Messung, als Tumorzellen angesehen. Nach dem Auffinden einer Zelle wird dann mit Hilfe des Blaufilters zur Darstellung der DAPI-Zellkerngegenfärbung beurteilt, ob der Zellkern vollständig und intakt ist. Sofern dies der Fall ist, wird diese Zelle mittels Orangefilter auf HER2/neu-Amplifikate hin untersucht. Dabei werden nur Signale gezählt, die eindeutig intranucleär liegen und deutlich voneinander getrennt sind. Durch Durchfokussieren ist es möglich die Zelle vollständig zu betrachten und Signale in verschiedenen Bildebenen zu finden. Die grünfluoreszierenden CEP-17-Signale werden aufgrund der Farbinterferenz zu den ebenfalls grünfluoreszierenden Anti-EpCAM-Antikörpern nicht mit gezählt, auch wenn sie teilweise abgrenzbar sind.

Das Auszählen der HER2/neu-Signale erfolgt an insgesamt 20 Zellen. Die Einstufung erfolgt dabei folgendermaßen: Zellen mit 2 Amplifikaten, 3 bis 5 Amplifikaten, 6 bis 10 Amplifikaten, mehr als 10 Amplifikaten und mehr als 20 Amplifikaten. Entsprechend der Leitlinien zur Auswertung der HER2-FISH-Untersuchung am Gewebe gilt eine Patientin als HER2-positiv, wenn mehr als 50% der ausgezählten Zellen ≥ 6 Amplifikate aufweisen.

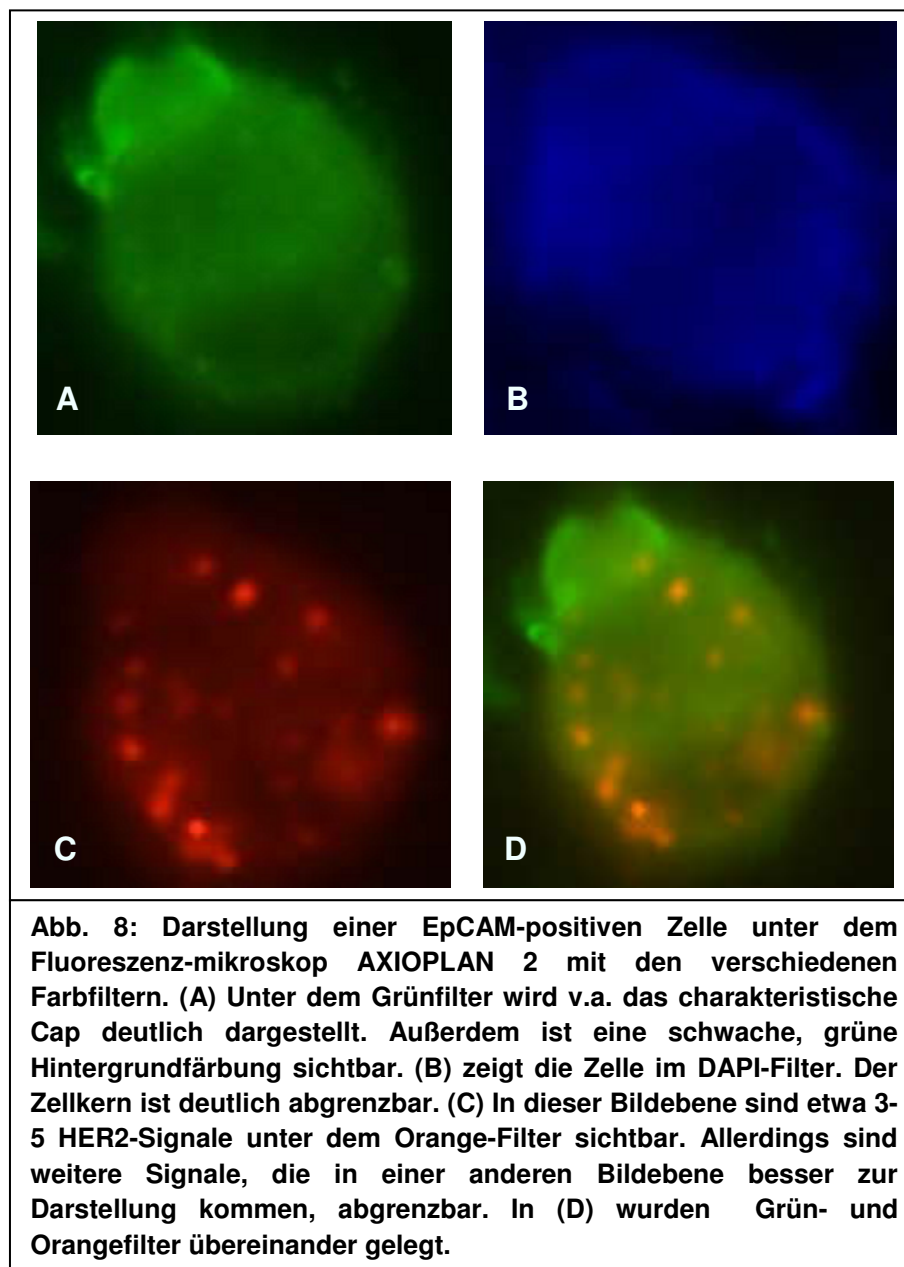
Einzelne Fälle, in denen keine ausreichende Zahl von vermeintlichen Tumorzellen auf dem Objektträger vorhanden waren, gingen in die Auswertung nicht mit ein.

Die Auswertung erfolgte immer durch die gleiche Person. Mithilfe der AxioCam ist es außerdem möglich, Zellen auf dem Objektträger zu fotografieren.

4.4 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der Arbeit wurden Excel, sowie die Statistik-Software SPSS 17.0 verwendet. Hauptsächlich wurden Kreuztabellen und Verlaufsdiagramme zur Veranschaulichung der Ergebnisse erstellt. Zur Überprüfung statistischer Zusammenhänge wurden der Pearson-Chi-Quadrat-Test sowie der exakte Test nach Fisher genutzt, (da zur Anwendung des ersteren meist nicht genügend Ereignisse vorlagen.) Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Beispiele für die Auswertung:



5 Ergebnisse

5.1 Zusammensetzung des Patientengutes

160 Blutproben von 69 Patientinnen wurden auf CETC mittels Scan[^]R untersucht. Parallel dazu erfolgte die HER2-FISH-Analyse von CETC.

Bei 94 Blutproben von insgesamt 56 Patientinnen war die CETC-Zahl auf dem Objektträger ausreichend für eine parallele HER2-FISH-Analyse an CETC. In 57 Fällen waren weniger als die erforderlichen 20 EpCAM-positiven CETC auswertbar, sodass diese nicht hinsichtlich des HER2-Status[´] beurteilt werden konnten. Bei weiteren 9 HER2-FISH-Analysen kam es zu Präparationsfehlern.

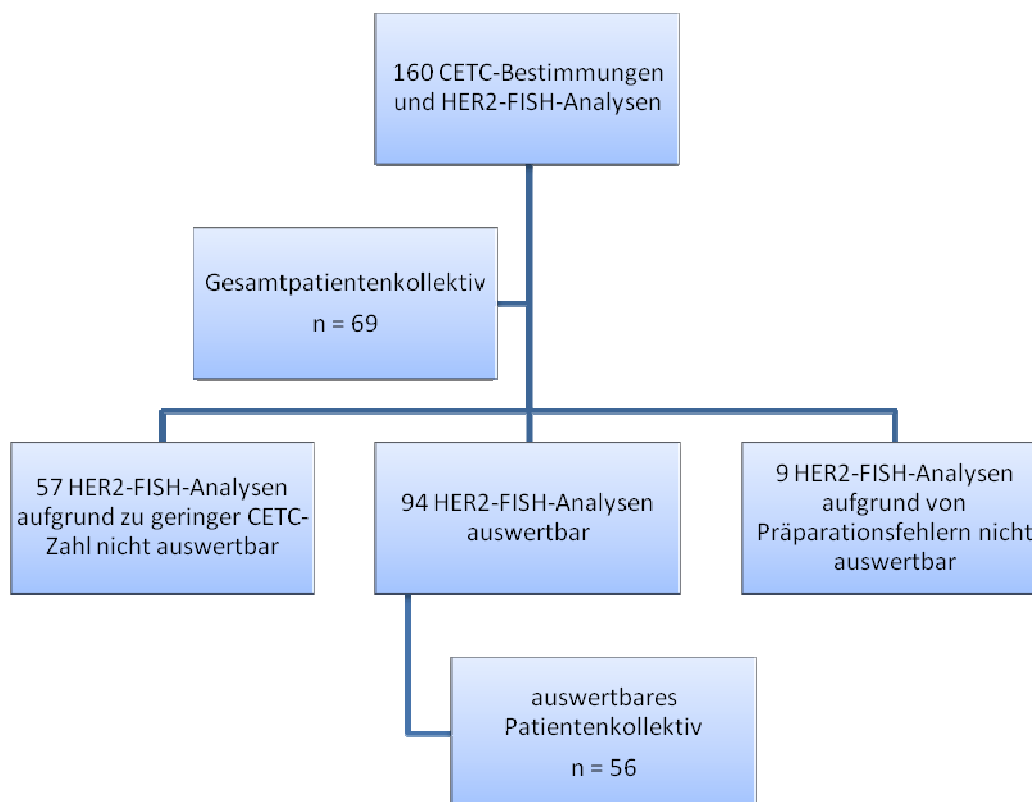


Abb. 9: Übersicht zur Probenanalyse.

Das auswertbare Patientenkollektiv umfasste 56 Patientinnen im Alter zwischen 22 und 85 Jahren mit invasivem Mammakarzinom. Das durchschnittliche Alter der Patientinnen betrug 56,6 Jahre. Der Median lag bei 59 Jahren.

Die Zusammensetzung des auswertbaren Patientenkollektivs hinsichtlich des TNM-Stadiums und anderer tumorbiologischer Faktoren ist aus Tabelle 6 ersichtlich.

Klinische Daten/Prognosefaktoren	absolut	relativ (%)
Geschlecht		
männlich	0	0,0
weiblich	56	100,0
Alter		
≤ 50	14	25,0
> 50	42	75,0
Tumorgroße		
pT1	27	48,2
pT2	23	41,1
pT3	0	0,0
pT4	4	7,1
pTx	2	3,6
Lymphknotenbefall		
pN0	31	55,4
pN1	18	32,1
pN2	4	7,1
pN3	1	1,8
pNx	2	3,6
Metastasierung		
M0	39	69,6
M1	17	30,4
ossär	11	19,6
cerebral	3	5,4
hepatisch	6	10,7
pulmonal	5	8,9
Tumorgrading		
G1	6	10,7
G2	24	42,9
G3	24	42,9
Gx	2	3,6
ER-/PgR-Status		
positiv	47	83,9
negativ	8	14,3
unklar	1	1,8
HER2/neu-Status		
positiv	0	0,0
negativ	56	100,0
0	22	39,3
1+	22	39,3
2+ (FISH negativ)	12	21,4
Total	56	100,0

Tab. 6: Patientendaten des Patientenkollektivs.

Der überwiegende Teil der Patientinnen (89,3%) wurde in frühen Tumorstadien (T1 oder T2) diagnostiziert. Bei 41% der Patientinnen war schon zum Diagnosezeitpunkt ein Lymphknotenbefall nachweisbar. 17 Patientinnen hatten zum Untersuchungszeitpunkt bereits Fernmetastasen, wobei 8 Patientinnen primär metastasiert waren (zum Zeitpunkt der Erstdiagnose) und neun Patientinnen erst im weiteren Verlauf Fernmetastasen entwickelten. Je 42,9% der Primärtumoren waren mäßig oder schlecht differenziert.

Eine Patientin entwickelte im Untersuchungszeitraum ein Lokalrezidiv, eine andere Patientin entwickelte einen Progress der bereits bekannten Lebermetastasen. Bei einer weiteren Patientin kam es etwa 2 Jahre nach der Untersuchung zu einem Lymphknotenrezidiv.

47 Patientinnen (83,9%) hatten einen positiven Östrogen- und/ oder Progesteronrezeptorstatus.

8 Patientinnen wiesen einen negativen Hormonrezeptorstatus auf. Da das Patientenkollektiv ausschließlich aus Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor besteht, können diese 8 Patientinnen auch als triple negativ (ER-/PgR-/HER2-) bezeichnet werden.

n=56		absolut	relativ (%)
Hormonrezeptorstatus	ER+	45	80,36
	ER-	10	17,86
	PgR+	43	76,79
	PgR-	12	21,43
	ER+/PgR+	41	73,21
	ER+/PgR-	4	7,14
	ER-/PgR+	2	3,57
	ER-/PgR-	8	14,29
	unklar	1	1,79

Tabelle 7: Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus in Absolut- und Relativwert.

In Bezug auf den vom Pathologen immunhistochemisch beziehungsweise mit FISH bestimmten HER2-Gewebestatus des Primärtumors setzte sich das Kollektiv folgendermaßen zusammen:

22 Patientinnen wurden mit dem IHC-Score 0 und 22 Patientinnen mit dem IHC-Score 1+ bewertet. 16 Patientinnen wurden immunhistochemisch zunächst als 2+

eingestuft. In der nachfolgend durchgeführten FISH konnte jedoch keine Amplifikation des HER2-Gens nachgewiesen werden.

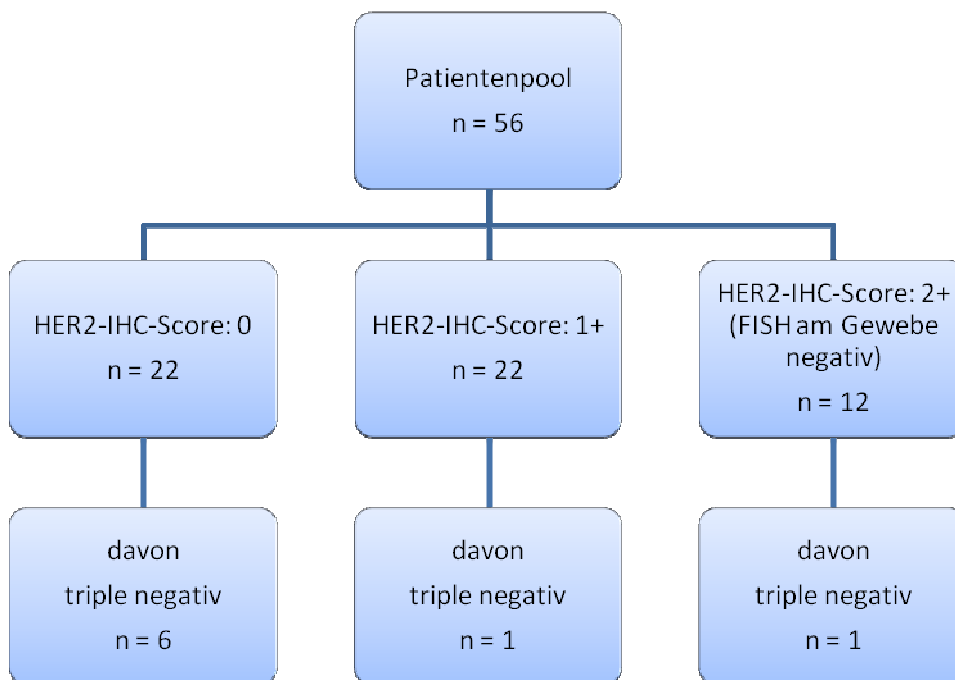


Abb. 10: Darstellung der Untergruppen hinsichtlich des immunhistochemisch bestimmten HER2-Status

Die Untersuchung der Blutproben fand unabhängig von der jeweiligen Behandlung und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Therapieverlauf der einzelnen Patientinnen statt.

Insgesamt wurden 14 Patientinnen mit einer neoadjuvanten und 30 Patientinnen mit einer primär adjuvanten Chemotherapie behandelt. Die am häufigsten verwendeten Schemata/Regime sind in Tabelle 8 dargestellt.

Zudem kamen insbesondere bei Progress weitere Mono- und Kombinationschemotherapien zum Einsatz. Hierzu zählen: Vinorelbin, Gemcitabin, Capecitabin, Bleomycin, Docetaxel-Mono, Paclitaxel-Mono.

Außerdem kamen insbesondere bei ossärer Metastasierung oder endokriner Therapie verschiedene Bisphosphonate wie Zoledronat oder Ibandronat parallel zum Einsatz.

4 Patientinnen erhielten weder eine adjuvante, noch eine neoadjuvante Chemotherapie. Bei 8 Patientinnen lagen keine Daten über den Therapieverlauf vor.

33 von 47 hormonrezeptorpositiven Patientinnen erhielten eine entsprechende endokrine Therapie. Dabei kamen vor allem das Antiöstrogen Tamoxifen sowie die Aromataseinhibitoren Exemestan, Anastrozol und Letrozol zum Einsatz. Einige Patientinnen erhielten außerdem die GnRH-Analoga Goserelin oder Leuprorelin.

<u>Neoadjuvante Chemotherapieschemata</u>	
4 x EC → 4 x D/P	Epirubicin, Cyclophosphamid → Docetaxel / Paclitaxel
3 x E → 3 x P → 3 x CMF	Epirubicin → Paclitaxel → Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
6xDAC	Docetaxel, Doxorubicin, Cyclophosphamid
6xP/D → (adjuvant: EC)	Paclitaxel / Docetaxel → Epirubicin, Cyclophosphamid
<u>Adjuvante Chemotherapieschemata</u>	
6xFEC	5-Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid
3xFEC → 3xD/P	5-Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid → Docetaxel / Paclitaxel
4xEC → 4xD/P	Epirubicin, Cyclophosphamid → Docetaxel / Paclitaxel
6xCMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
6xDC	Docetaxel, Cyclophosphamid
4 x EP(ET)	Epirubicin, Paclitaxel (Taxol)

Tab. 8: Darstellung der eingesetzten adjuvanten und neoadjuvanten Chemotherapieregime.

5.2 Einteilung in Untergruppen

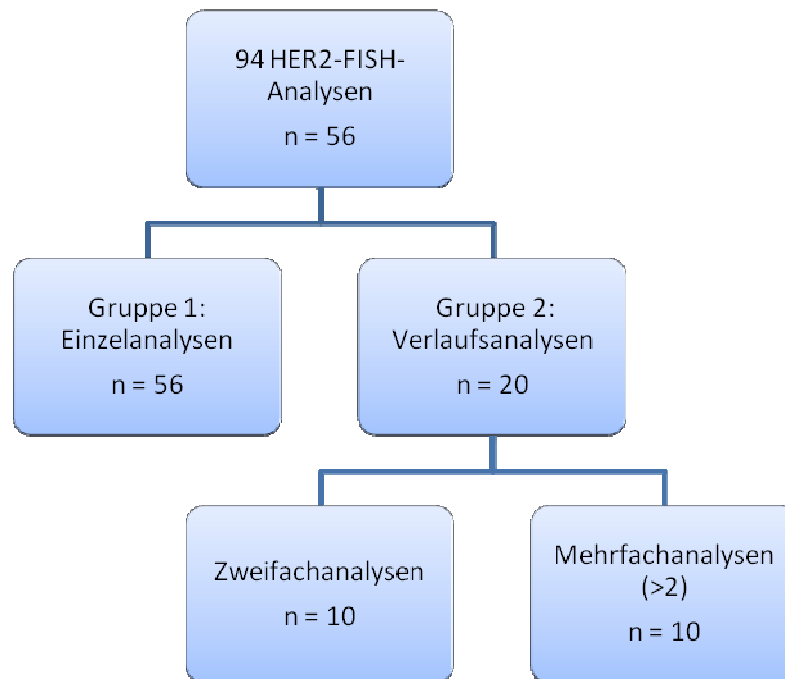


Abb. 11: Schema zur Einteilung in Untergruppen.

Hinsichtlich der Anzahl der durchgeführten HER2-FISH-Analysen je Patientin wurde das Patientenkollektiv für die nachfolgende Auswertung der Ergebnisse in zwei Gruppen unterteilt, in die Einzel- und Verlaufsanalysen.

In die Gruppe der Einzelanalysen sind sowohl die 36 Patientinnen eingeschlossen, bei denen nur eine einzige Messung durchgeführt wurde, als auch die jeweils erste Messung der Patientinnen, die im Verlauf mehrfach untersucht wurden.

Bei insgesamt 20 Patientinnen wurden mindestens zwei Analysen/Messungen durchgeführt. Hierunter fallen 10 Patientinnen mit Zweifachbestimmung, vier Patientinnen mit drei Verlaufsanalysen, fünf Patientinnen mit vier Untersuchungen und eine Patientin mit sechs Verlaufsmessungen (Summe = 58 Verlaufsanalysen).

Die Patientinnen mit Zweifachbestimmung wurden, auch wenn kein Verlauf im eigentlichen Sinne dargestellt werden kann, mit zu dieser Gruppe gezählt, da zumindest eine tendenzielle Aussage getroffen werden konnte.

5.3. Auswertung

5.3.1. Betrachtung der Einzelanalysen

Pst.-Nr.	HER2-Status des Primärtumors (Gewebe)	Zellen mit 6-10 Amplifikaten	Zellen mit >10 Amplifikaten	Anteil HER2-amplifizierter Zellen (%)	HER2-Status der CETC
1	triple negativ (0)	6	14	100	pos
2	triple negativ (0)	8	4	60	pos
3	1+	6	3	45	neg
4	1+	8	0	40	neg
5	triple negativ (1+)	7	6	65	pos
6	1+	11	0	55	pos
7	0	11	3	70	pos
8	2+	11	2	65	pos
9	1+	4	10	70	pos
10	0	5	3	40	neg
11	1+	9	6	75	pos
12	2+	4	14	90	pos
13	2+	6	1	35	neg
14	0	2	0	10	neg
15	0	8	3	55	pos
16	1+	4	2	30	neg
17	2+	10	5	75	pos
18	1+	10	6	80	pos
19	0	9	0	45	neg
20	1+	9	7	80	pos
21	triple negativ (0)	6	13	95	pos
22	2+	8	1	45	neg
23	1+	3	3	30	neg
24	0/1+	7	4	55	pos
25	2+	8	1	45	neg
26	2+	5	15	100	pos
27	0	6	14	100	pos
28	1+/2+	3	0	15	neg
29	0	12	1	65	pos
30	2+	11	4	75	pos
31	1+	4	3	35	neg
32	0	4	11	75	pos
33	triple negativ (0)	7	3	50	pos
34	1+	5	9	70	pos
35	1+	10	2	60	pos
36	0	10	1	55	pos
37	triple negativ (2+)	6	1	35	neg
38	1+	8	1	45	neg
39	1+	1	0	5	neg
40	1+	6	8	70	pos
41	triple negativ (0)	7	0	35	neg
42	1+	4	4	40	neg
43	0	12	3	75	pos
44	1+	5	0	25	neg
45	2+	6	3	45	neg

46	0	6	1	35	neg
47	1+	11	2	65	pos
48	0	10	1	55	pos
49	triple negativ (0)	9	5	70	pos
50	0	7	1	40	neg
51	2+	2	5	35	neg
52	1+	9	0	45	neg
53	2+	6	4	50	pos
54	0	8	0	40	neg
55	0	5	5	50	pos
56	1+	9	5	70	pos

Tab. 9: Auflistung der Einzelanalysen.

Insgesamt wurden 56 Einzelmessungen unabhängig von der gemessenen CETC-Zahl hinsichtlich folgender Gesichtspunkte/Fragestellungen aufgearbeitet:

- (1) Finden wir mit unserer Methode zirkulierende epitheliale Tumorzellen mit Amplifikation des HER2-Gens trotz HER2-negativen Primärtumors und wieviele Patienten sind nach unserer Grenzwertdefinition als HER2-positiv einzustufen?
- (2) Korreliert die Zahl im Scan^{AR} detektierter CETC mit dem Anteil HER2-amplifizierter CETC?
- (3) Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem ermittelten HER2-Status der CETC und dem HER2-Status des Primärtumors (immunhistochemischer DAKO-Score)?
- (4) Besteht ein Zusammenhang zwischen der Zahl der amplifizierten CETC und dem Metastasierungsstadium?
- (5) Gibt es eine Korrelation zwischen dem Hormonrezeptorstatus des Primärtumors und dem Anteil HER2-amplifizierter CETC?
- (6) Korreliert der histologische Tumorgrad mit dem HER2-Status der CETC?

Zu (1)

Die Einzelanalysen/-messungen ergaben, dass bei allen Patientinnen mindestens eine CETC mehr als 5 Amplifikate aufwies. Nach der vorab festgelegten Grenzwertdefinition, die sich an den ASCO-Richtlinien orientiert und wonach mindestens 50% der 20 untersuchten CETC mehr als 5 Amplifikate aufweisen müssen, um als HER2-positiv zu gelten, haben 32 Patientinnen (57,1%) einen positiven HER2-Status.

n=56	HER2-Status der CETC	
	positiv	negativ
	32 (57,1%)	24 (42,9%)

Tab. 10: Häufigkeitsverteilung des HER2-Status der CETC.

Zu (2)

Die durchschnittlich detektierte Zellzahl bei der Scan^R-Messung lag bei 10281 CETC pro 7,5 ml Blut. Der Median lag bei 6485 CETC (Minimum 240 CETC, Maximum 48910 CETC). Wie Abb. 12 verdeutlicht, korreliert der Anteil HER2-amplifizierter CETC nicht mit der Gesamt-CETC-Zahl.

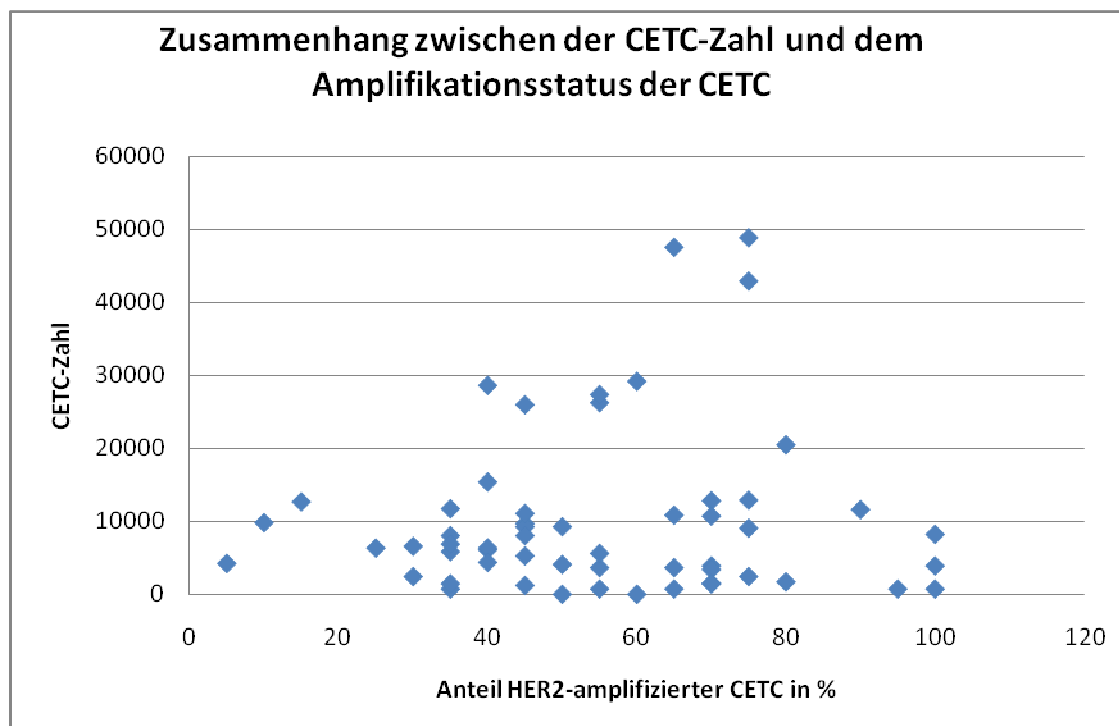


Abb. 12: Zusammenhang zwischen der CETC-Zahl und dem Amplifikationsstatus der CETC.

Nachfolgend werden exemplarisch einige CETC mit unterschiedlichem Amplifikationsstatus dargestellt (Abb. 15 und 16). Zur übersichtlicheren Auswertung der Daten wurden die ursprünglichen Kategorien auf letztendlich drei verschiedene zusammengefasst: weniger als 6 Gensignale, 6 bis 10 Gensignale und mehr als 10 Amplifikate.

Abbildung 13 zeigt zum Vergleich eine HER2-FISH-Analyse, wie sie vom Pathologen am Gewebe durchgeführt wird. Es wird deutlich, dass bei der Beurteilung der zirkulierenden Tumorzellen häufig auch kleinere Fluoreszenzsignale zum Vorschein kommen, die am fixierten Gewebe kaum gesehen werden. Durch das Durchfokussieren der einzelnen Zellen kann zudem die gesamte Zelle in verschiedenen Bildebenen beurteilt werden. Anders als bei der FISH-Analyse am formalinfixierten Gewebe können wir trotz Verwendung eines Zweifarben-ISH-Kits nur die HER2-Gensignale sicher abgrenzen, da sowohl die CEP17-Sonde als auch die Anti-EpCAM-Färbung grün fluoreszieren. Deshalb ist auch die Bildung der FISH-Ratio nicht immer sicher möglich.

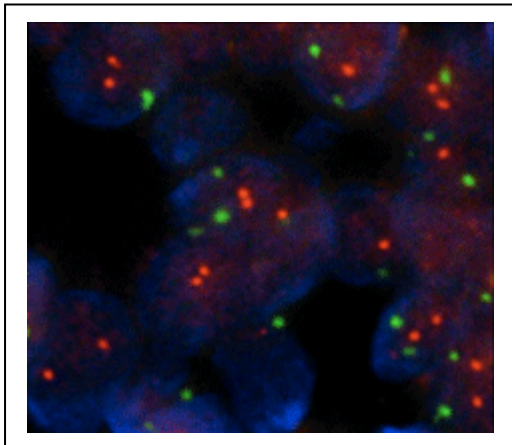


Abb. 13: Darstellung einer FISH-Analyse am formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe (Hicks et al. 2008).

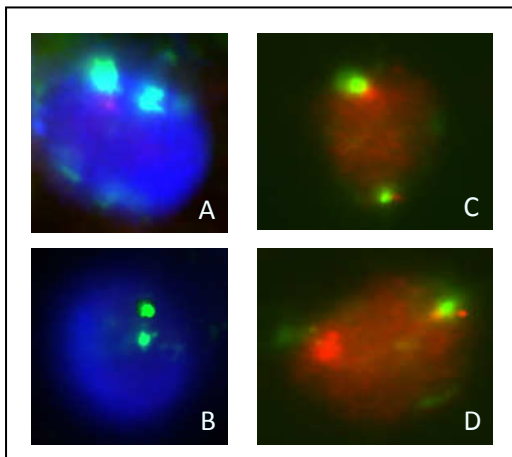
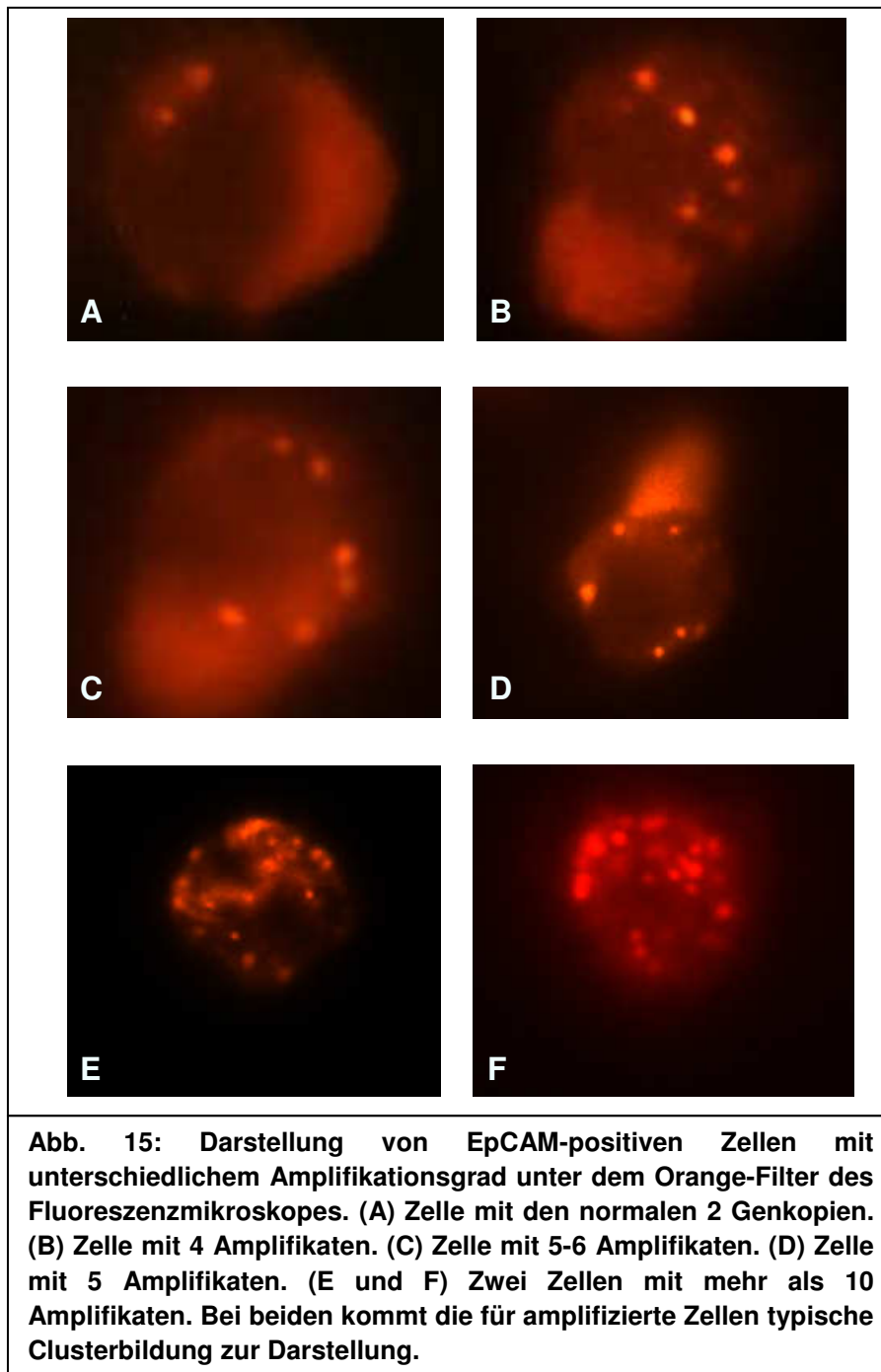
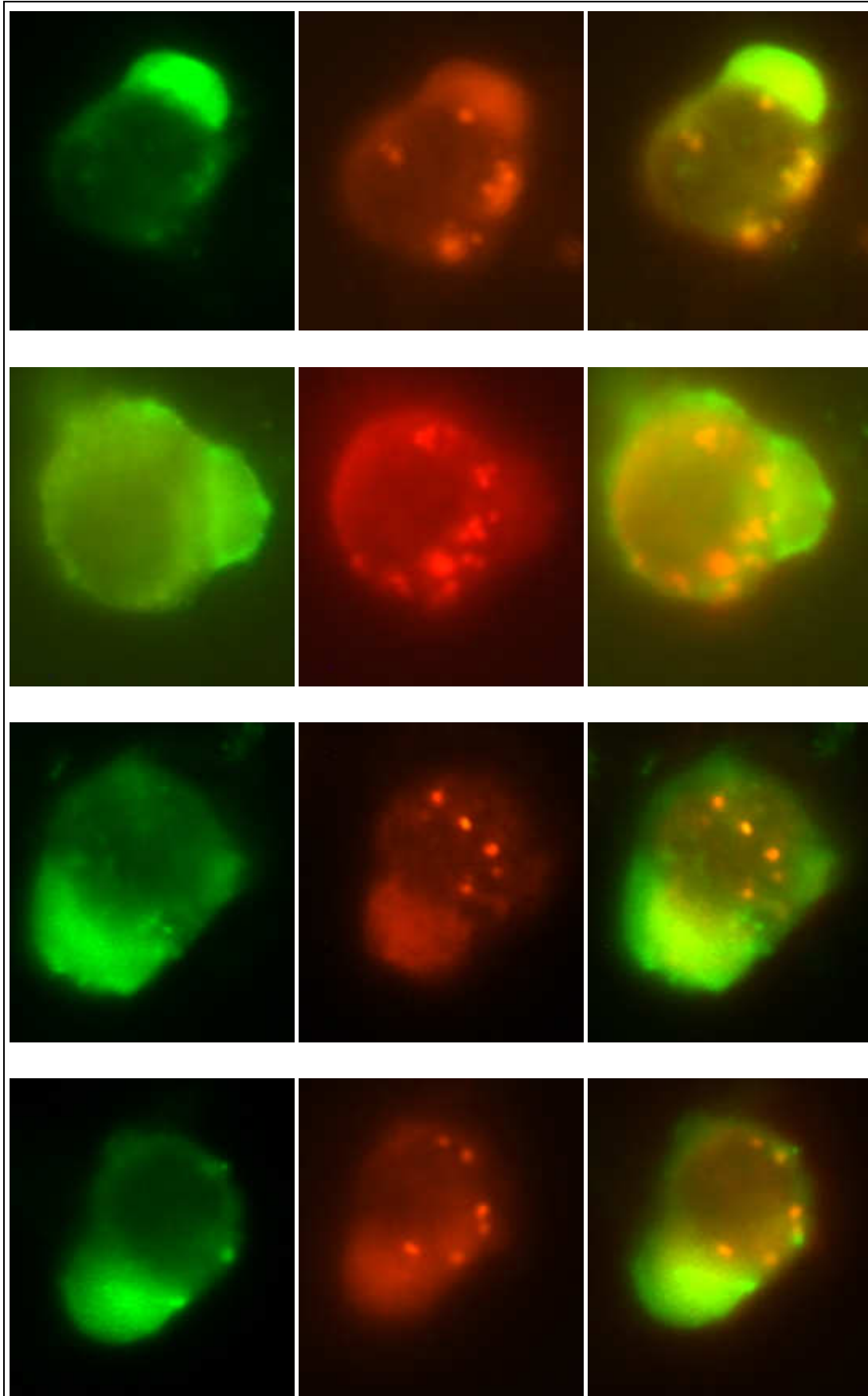


Abb. 14 (A-D): Darstellung von vier Granulocyten. (A+B) Zwei Granulocyten unter dem DAPI-Blaufilter mit jeweils zwei grün fluoreszierenden CEP17-Signalen. (C+D) Zwei weitere Granulocyten mit Darstellung der grün fluoreszierenden CEP17-Signale und der rot/orange-fluoreszierenden HER2-Gensignale.





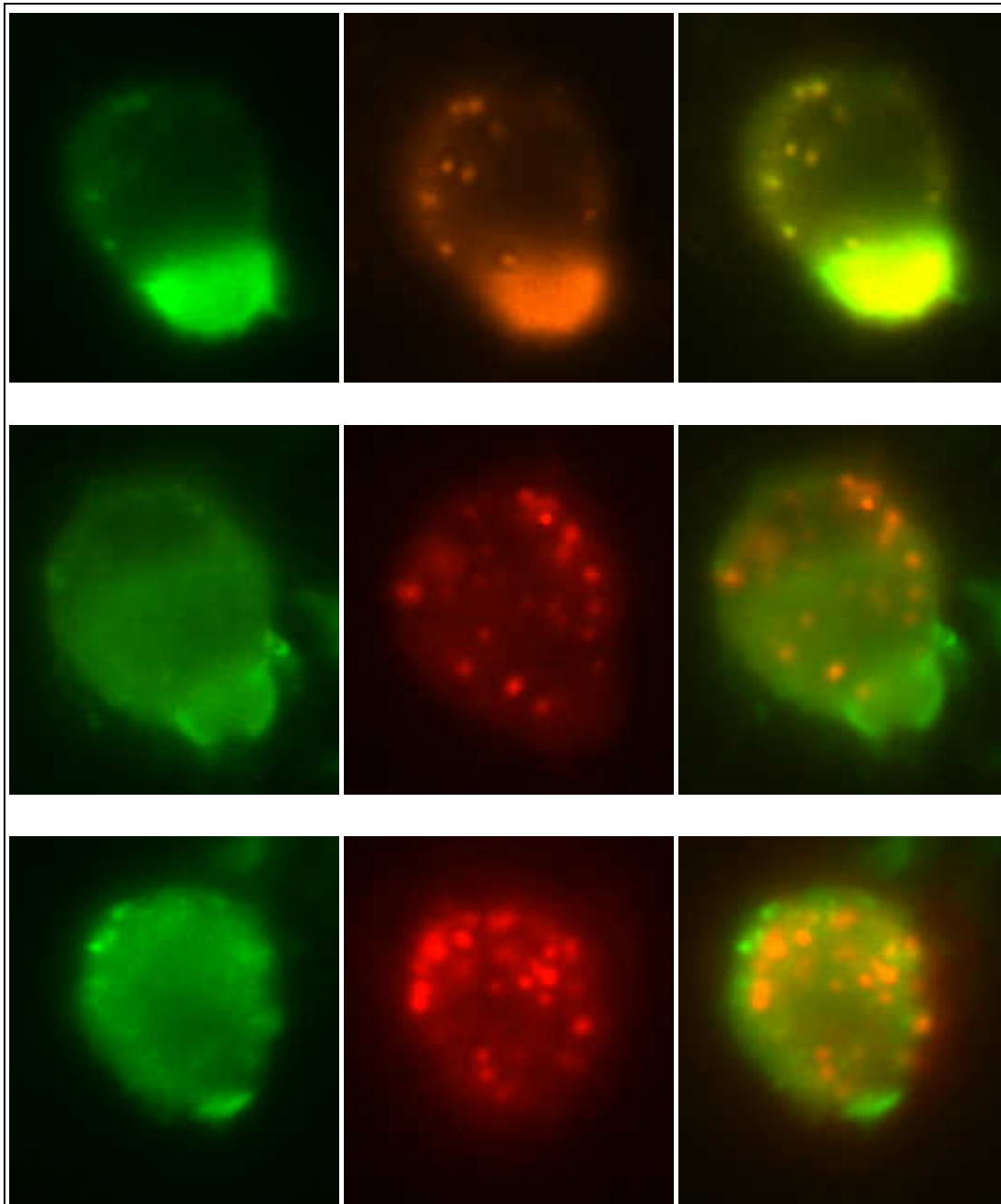


Abb. 16: Darstellung von sieben EpCAM-positiven Zellen mit unterschiedlichem Amplifikationsgrad von HER2/neu im Grünfilter (linke Spalte), im Orange-Filter (mittlere Spalte) und in der Überlagerung beider Filter (rechte Spalte).

Zu (3)

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem immunhistochemisch bestimmten HER2-Gewebestatus und dem durch FISH ermittelten HER2-Status der CETC beruht auf der Überlegung, dass man möglicherweise bei Tumoren mit einem DAKO-Score von 2+ mehr HER2-positive CETC im Blut findet als bei Mammakarzinomen mit einem DAKO-Score von 0.

Diese Hypothese konnte in dieser Studie allerdings nicht belegt werden. Wie aus Tabelle 11 ersichtlich ist, waren 68% anhand der CETC beurteilten Blutproben von mit „0“ bewerteten Primärtumoren als HER2-positiv einzustufen. Entgegen der geäußerten Vermutung war der HER2-Status der CETC bei höher klassifizierten Tumoren nur in 50% der Fälle positiv. Somit liegt kein statistisch signifikanter Zusammenhang vor.

HER2-Status des Primärtumors	HER2-Status der CETC	
	positiv	negativ
0 (n=22)	15 (68,2)	7 (31,8%)
1+ (n=22)	11 (50%)	11(50%)
2+ / FISH negativ (n=12)	6 (50%)	6 (50%)

Tab. 11: Zusammenhang zwischen dem HER2-Status der CETC und dem HER2-Status des Primärtumors.

$p = 0,41$ nach 3x2 Chi-Quadrat-Test

$p = 0,18$ nach 2x2 Chi-Quadrat-Test (1+/2+ vs. 0)

Zu (4)

Von 17 Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits Fernmetastasen entwickelt hatten, konnten 13 Patientinnen (76,5%) anhand der CETC als HER2-positiv bezeichnet werden. Nach dem Fisher Exact-Test liegt hierbei eine 2seitige Signifikanz von 0,079 und eine 1seitige Signifikanz von 0,049 vor.

Demnach ist zumindest ein Trend dahingehend abzulesen, dass der Anteil HER2-amplifizierter CETC bei Patientinnen in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien höher liegt als bei frühen, nicht fernmetastasierten Mammakarzinomen.

Metastasierungsstatus	HER2-Status der CETC	
	positiv	negativ
M0 (n=39)	19 (48,7%)	20 (51,3%)
M1 (n=17)	13 (76,5%)	4 (23,5%)

Tab. 12: Zusammenhang zwischen dem Metastasierungsstadium und dem HER2-Status der CETC.

p = 0,079 nach 2x2 Fisher Exact

Zu (5)

Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen dem Hormonrezeptorstatus des Primärtumors und dem anhand der CETC ermittelten HER2-Status muss (ebenfalls) vorerst verneint werden. Allerdings scheinen insbesondere triple negative Patientinnen etwas häufiger HER2-positive CETC zu haben. Während bei hormonrezeptorpositiven Patientinnen ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis zwischen HER2-positiven und HER2-negativen Befunden vorlag, waren 6 (75%) von 8 triple negativen Patientinnen als HER2-positiv einzustufen (p=0,26). Bei der genauen Aufschlüsselung des Hormonrezeptorstatus zeigt sich zudem, dass 8 von 10 Patientinnen mit negativem Östrogenrezeptorstatus einen positiven HER2-Status aufwiesen. Das Signifikanzniveau lag bei p=0,12.

Hormonrezeptorstatus	HER2-Status der CETC	
	positiv	negativ
ER+/PgR+ (n=41)	22 (53,7%)	19 (46,3%)
ER+/PgR- (n=4)	2 (50%)	2 (50%)
ER-/PgR+ (n=2)	2 (100%)	0 (0%)
ER-/PgR- (triple negativ) (n=8)	6 (75%)	2 (25%)

Tab.13: Zusammenhang zwischen dem Hormonrezeptorstatus und dem HER2-Status der CETC.

p = 0,54 nach 4x2 Fisher Exact

p = 0,12 nach 2x2 Fisher Exact (ER- vs. ER+)

Hormonrezeptorstatus	HER2-Status der CETC	
	positiv	negativ
positiv (n=47)	26 (55,3%)	21 (44,7%)
negativ (triple negativ) (n=8)	6 (75%)	2 (25%)

Tab.14: Zusammenhang zwischen dem Hormonrezeptorstatus und dem HER2-Status der CETC.

p = 0,26 nach 2x2 Fisher Exact

Zu (6)

Auch hinsichtlich des histologischen Tumorgades konnte kein signifikanter Zusammenhang zum HER2-Status der CETC nachgewiesen werden. Dennoch war der HER2-Status der CETC bei gut differenzierten Tumoren häufiger negativ als positiv.

Grading	HER2-Status der CETC	
	positiv	negativ
G1 (n=6)	2 (33,3%)	4 (66,7%)
G2 (n=24)	16 (66,7%)	8 (33,3%)
G3 (n=24)	13 (54,2%)	11 (45,8%)
Gx (n=2)	1	1

Tab.15: Zusammenhang zwischen dem histologischen Grading und dem HER2-Status der CETC.

p = 0,34 bei 3x2 Fisher Exact

p = 0,38 bei 2x2 Fisher Exact (G2/3 vs. G1)

5.3.2 Betrachtung der Verlaufsanalysen

Die nachfolgenden Verlaufsanalysen wurden im Kontext zur Kinetik der gemessenen CETC-Zahlen betrachtet.

Für die Auswertung wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende Messungen eines Patienten betrachtet und miteinander verglichen.

Ein Anstieg oder Abfall der CETC-Zahl lag vor, wenn sich beide Analysen um mindestens 1000 Zellen unterschieden. Auch der Anteil HER2-amplifizierter Zellen wurde in Anstieg, Abfall und gleichbleibend kategorisiert. Erst eine Änderung des Anteils HER2-positiver CETC von mindestens 10% (entspricht 2 Zellen) wurde als Anstieg bzw. Abfall gewertet.

(Zudem wurden einige Beispielverläufe in Diagrammen dargestellt.)

Anhand der Verlaufsanalysen, sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- (1) Besteht ein Zusammenhang hinsichtlich der Kinetik des CETC-Verlaufes und dem ermittelten Anteil HER2-positiver CETC?
- (2) Kommt es im Verlauf zu Änderungen des HER2-Status der CETC oder bleibt dieser konstant?

Zu (1)

CETC-Zahl	Anteil HER2-amplifizierter CETC		
	Anstieg	Abfall	konstant
Anstieg	8	11	3
Abfall	2	6	3
konstant	2	3	0

Tab. 16: Zusammenhang zwischen dem Verlauf der CETC-Zahl und der Kinetik der HER2-amplifizierten Zellen.

Die Aufarbeitung der Verlaufsanalysen ergab 14 gleichsinnige (8 x Anstieg, 6 x Abfall) und 13 gegensätzliche (2 x CETC-Abfall bei gleichzeitigem HER2-Anstieg, 11x CETC-Anstieg verbunden mit einem HER2-Abfall) Änderungen von CETC-Zahl und dem Anteil amplifizierter CETC. Somit war eine Änderung der CETC-Zahl in 27 Fällen auch mit einer Änderung des Anteils amplifizierter CETC verbunden. Dabei reduzierte sich der Anteil der HER2/neu amplifizierten Zellen häufiger bei einem Abfall als bei einem Anstieg der CETC.

Nachfolgend werden beispielhaft einige Verläufe mit inverser und gleichsinniger Kinetik von CETC-Zahl und HER2-Amplifikation dargestellt.

Die Abbildungen 17 bis 22 zeigen den Verlauf der CETC-Zahl sowie des Anteils HER2-amplifizierter CETC von sechs Patientinnen. Außerdem wird aus den Diagrammen die Therapie ersichtlich, welche die Patientinnen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt erhielten. Allerdings wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Therapien auf den Verlauf nicht weiter untersucht.

Beispielverläufe für Patientinnen mit tendenziell inversem Verlauf (Abb. 17- 19):

Dargestellt werden exemplarisch die Verläufe von zwei Patientinnen mit drei Verlaufsmessungen und einer Patientin mit vier Verlaufsmessungen. In zwei Fällen kam es zu einem inversen Verlauf durch einen Anstieg der CETC-Zahl bei gleichzeitigem Abfall des Anteils HER2-amplifizierter Zellen (Abb. 17 und 19), sodass man auf eine Ausschwemmung von insbesondere HER2-negativen CETC rückschließen könnte. Bei diesen beiden Patientinnen kam es dabei außerdem zu einer beziehungsweise auch mehreren Änderungen des HER2-Status, wobei Patientin von Abbildung 17 im Rahmen der ersten Messung (45%) nur knapp unter der 50%-Grenze des Anteils HER2-amplifizierter Zellen lag. Trotz konstanter CETC-Zahl lag der Anteil amplifizierter Zellen bei der zweiten Messung bei 70%.

Abb. 18 zeigt ein Beispiel für einen Anstieg der HER2-amplifizierten Zellen bei gleichzeitigem Abfall der CETC-Zahl, wobei die Patientin bei allen drei Messungen nach unserer Grenzwertdefinition eindeutig als HER2-positiv einzustufen war.

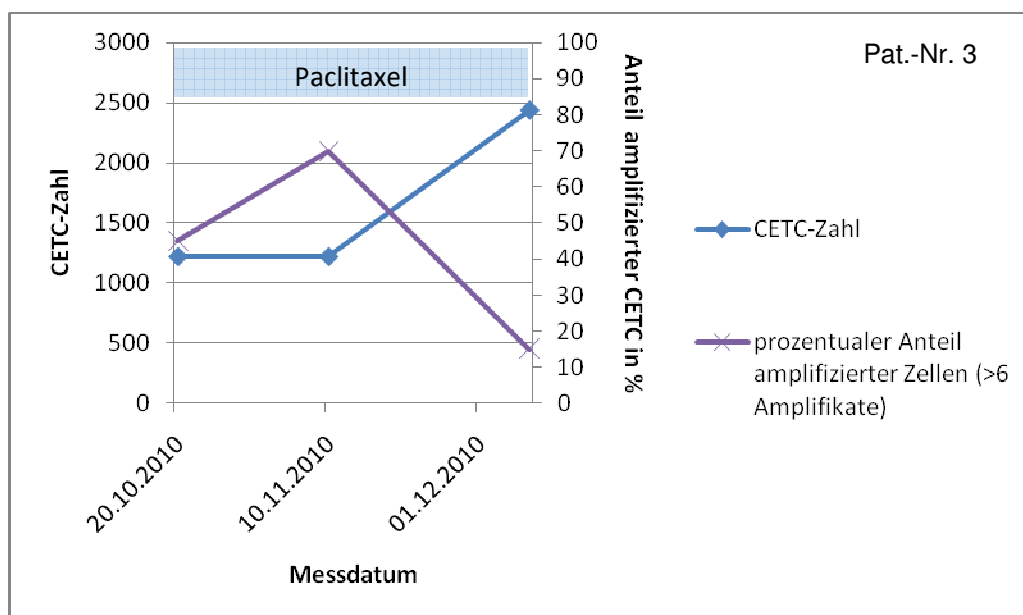


Abb. 17: Es handelt sich um eine Patientin mit primärem Mamma-Ca (T1N0M0G3; HR+, HER2 1+). Unter der adjuvanten Behandlung mit Paclitaxel blieb die CETC-Zahl zunächst konstant, während sich der Anteil HER2neu amplifizierter Zellen erhöhte. Dann stieg die Zahl der CETC bei gleichzeitigem Abfall des Anteils Her2/neu amplifizierter Zellen. Dies könnte darauf beruhen, dass es unter der Therapie mit dem Taxan zu einer Ausschwemmung von Zellen kommt, wie dies häufig beobachtet wurde. Jedoch wären die ausgeschwemmten Zellen in diesem Fall HER2/neu negativ.

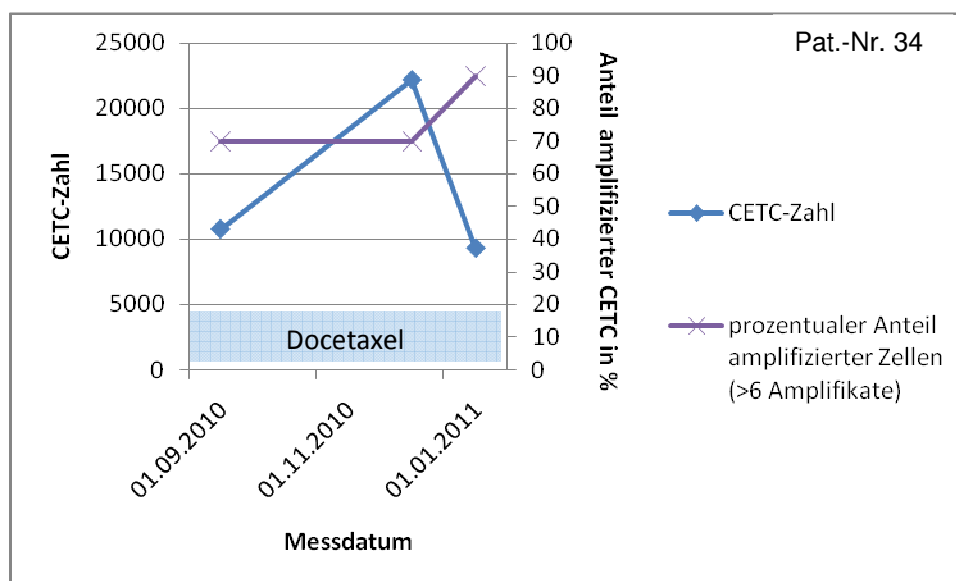


Abb. 18: Verlaufsdiagramm einer Patientin mit primärem Mamma-Ca (TXNXM0G2; HR+, HER2 1+) unter einer neoadjuvanten Chemotherapie mit Docetaxel. Während der Anteil HER2-amplifizierter CETC zwischen den ersten beiden Messungen trotz steigender CETC-Zahl konstant bleibt, wird der inverse Verlauf beim Vergleich der zweiten mit der dritten Analyse deutlich. HER2-positive CETC scheinen hier weniger auf die Chemotherapie anzusprechen, sodass die Patientin bei allen drei Messungen als HER2-positiv einzustufen/ zu klassifizieren ist.

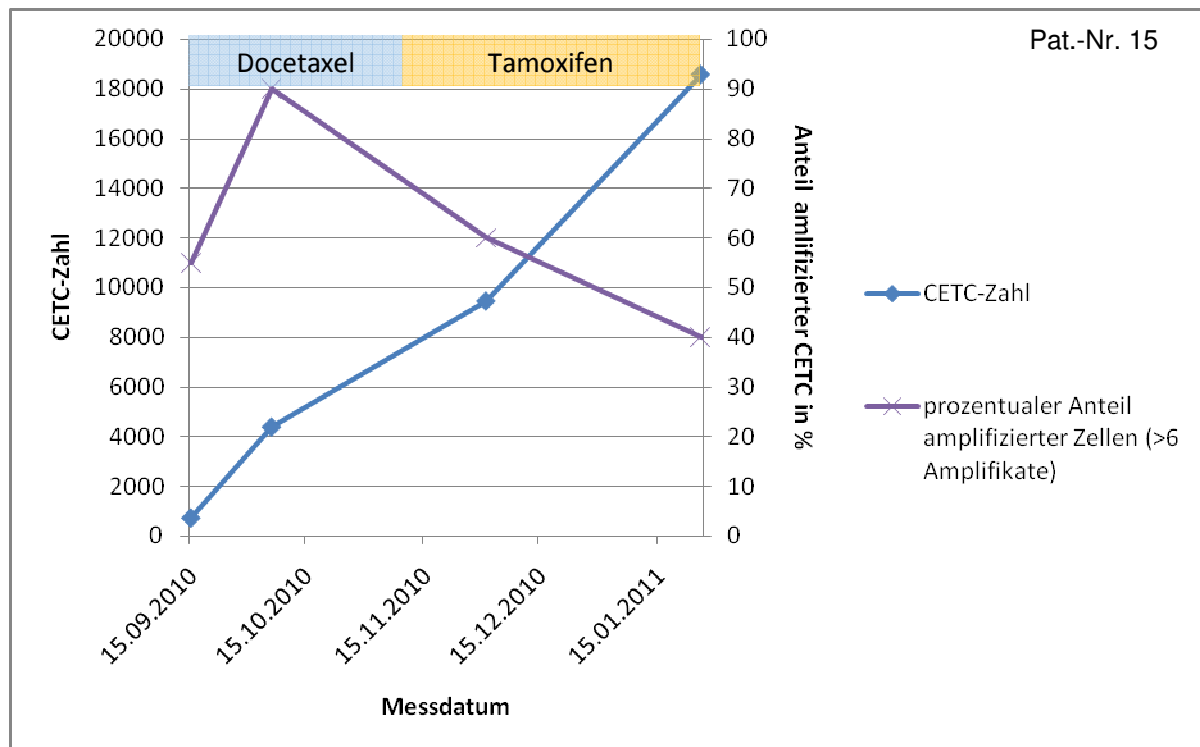


Abb. 19: Verlaufsdigramm einer Patientin mit metastasiertem Mamma-Ca (T2N1M1G1; HR+, HER2 0). Auch bei dieser Patientin stieg die Zellzahl unter der neoadjuvanten Taxantherapie an. Im Anschluss erhielt die Patientin eine endokrine Therapie. Auch hierunter kam es im Verlauf zu einem weiteren Anstieg der CETC-Zahl. Unter der Taxantherapie erhöhte sich zunächst auch der Anteil HER2-positiver CETC, möglicherweise durch Ausschwemmung von vor allem HER2/neu positiven Zellen. Unter der weiteren Hormonblockertherapie wurde aber offensichtlich eher das Wachstum HER2/neu negativer Zellen begünstigt, sodass es bei der Patientin sogar zur Änderung des HER2-Status kommt.

Beispielverläufe für Patientinnen mit tendenziell gleichsinnigem Verlauf
(Abb. 20 – 22):

Hierbei werden exemplarisch ebenfalls die Verläufe von drei Patientinnen dargestellt. In den Abbildungen 20 und 21 kommt es bei allen Messungen zu einer tendenziell gleichsinnigen Änderung der CETC-Zahl und des Anteils HER2-amplifizierter Zellen. Allerdings ändern sich die beiden Variablen zum Teil in unterschiedlichem Ausmaß. Abbildung 22 zeigt den Verlauf bei einer Patientin mit sechs Messungen. Bei drei von fünf aufeinanderfolgenden Messungen kommt es zu einer gleichsinnigen Änderung der CETC-Zahl und des Anteils HER2-amplifizierter Zellen. Lediglich bei Messung vier und fünf kommt es zunächst zu einem deutlichen Abfall des Anteils HER2-amplifizierter CETC bei gleichzeitigem Anstieg der CETC-Zahl und anschließend umgekehrt. Der Anteil HER2-amplifizierter Zellen schwankt bei dieser Patientin insgesamt jedoch sehr stark, sodass sich der HER2-Status nach unserer Grenzwertdefinition im Verlauf mehrfach ändert.

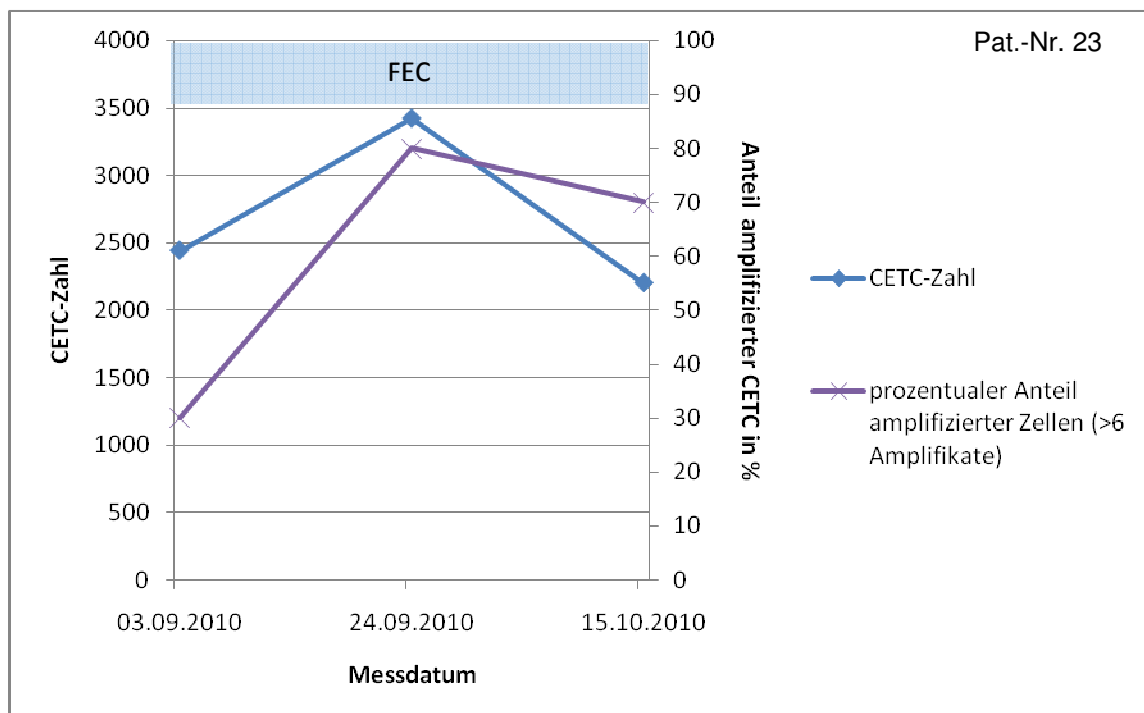


Abb. 20: Es handelt sich um eine Patientin mit primärem Mamma-Ca (T1N0M0G3; HR+, HER2 1+) unter einer adjuvanten FEC-Chemotherapie. Sowohl die CETC-Zahl als auch der Anteil HER2-amplifizierter Zellen steigen zunächst an. Es kommt demnach zur Ausschwemmung insbesondere von HER2-amplifizierten Zellen. Anschließend sinkt sowohl die CETC-Zahl als auch der Anteil der amplifizierten Zellen (, wenn auch in geringem Maße). Desweiteren wird ersichtlich, dass es zu einem Shift des HER2-Status der CETC zwischen der ersten und zweiten Messung von negativ zu positiv kommt.

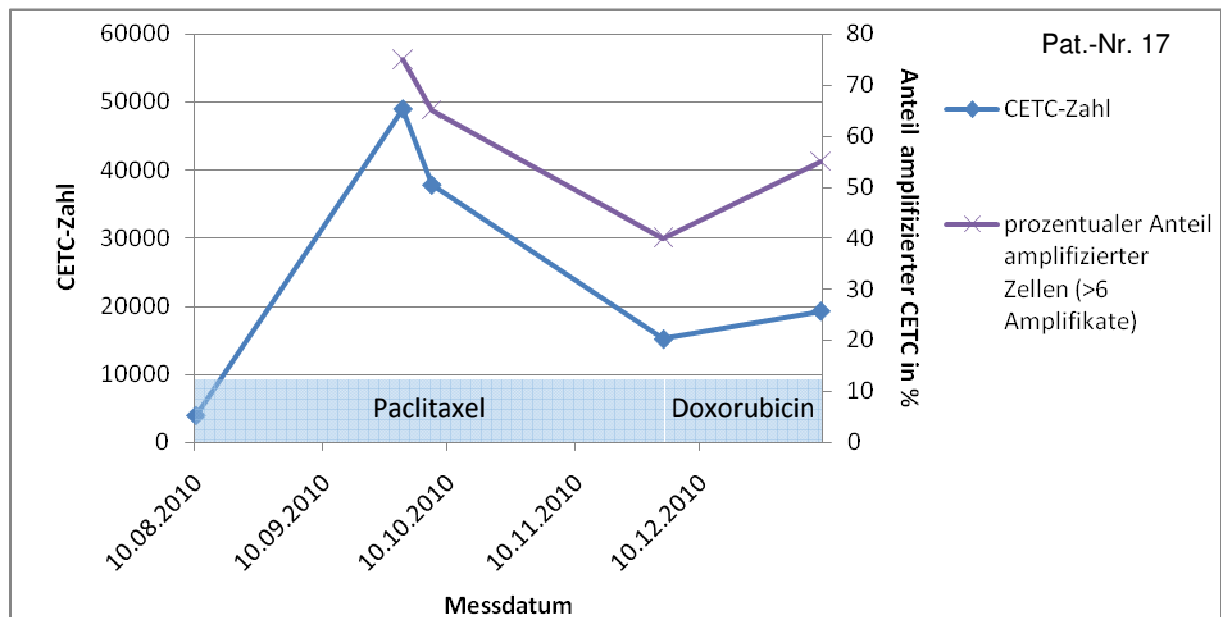


Abb. 21: Das Diagramm zeigt den Verlauf einer Patientin mit fortgeschrittenem Mamma-Ca (T1N1M1GX; HR+, HER2 2+) unter einer Chemotherapie mit Paclitaxel und sequenziell mit Doxorubicin. Die Patientin wurde im Vorfeld bereits mit Docetaxel und dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab behandelt. Unter Paclitaxel kam es erst zu einem steilen Anstieg der CETC-Zahl und anschließend zu einem kontinuierlichen Abfall der CETC-Zahl sowie des Anteils HER2-amplifizierter Zellen. Im Anschluß an den Anstieg wurde zwischen der zweiten und dritten Messung trotz des Abfalls der peripheren Zellen ein Progress der hepatischen Metastasierung festgestellt. Unter der angeschlossenen Doxorubicintherapie stiegen sowohl die CETC-Zahl, als auch der Anteil der amplifizierten Zellen.

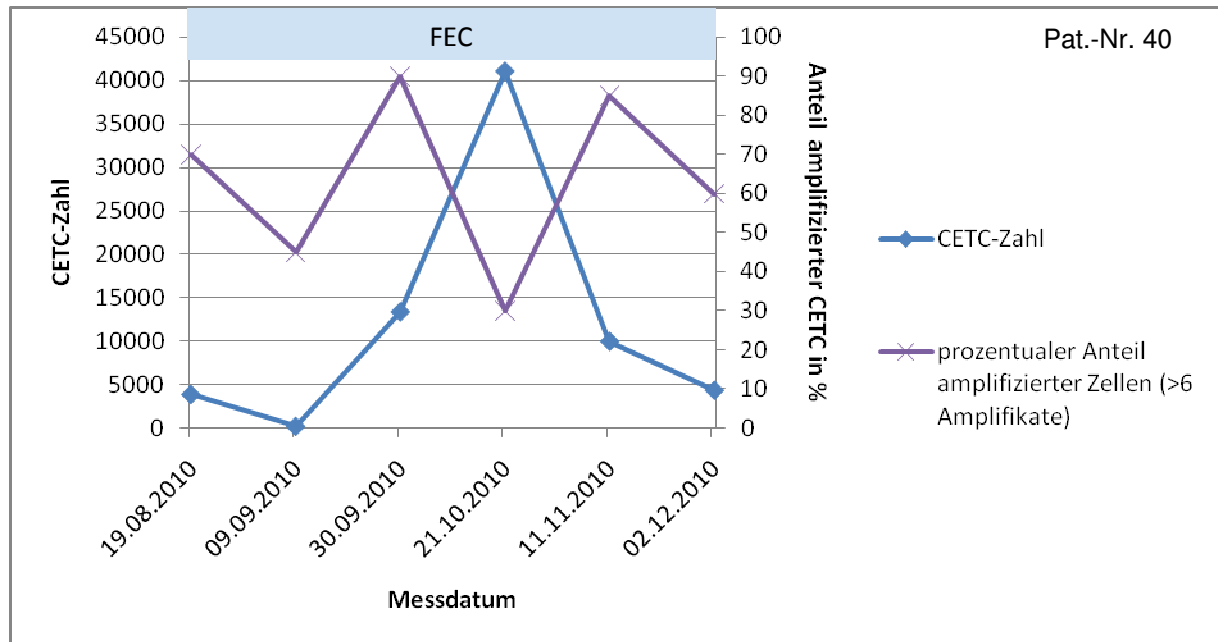


Abb. 22: Das Diagramm stellt den Verlauf bei einer Patientin mit primärem Mamma-Ca (T1N0M0G2; HR+, HER2 1+) unter einer FEC-Chemotherapie dar. Innerhalb von etwa dreieinhalb Monaten wurden 6 Messungen vorgenommen. Bis auf den inversen Verlauf zwischen dritter und fünfter Messung wird ein gleichsinniger Zusammenhang zwischen CETC-Zahl und dem Anteil HER2-amplifizierter CETC deutlich. Nach anfänglich sehr niedrigen gemessenen CETC-Zahlen kommt es in der Folge zunächst zu einer reichlichen Ausschwemmung von CETCs und anschließend wieder zu einem starken Abfall. Der Anteil HER2-amplifizierter Zellen verläuft überwiegend gleichsinnig. Lediglich bei der vierten Messung, also dem Peak der CETC-Zahl, sinkt der Anteil amplifizierter Zellen auf etwa 30%. Der Verlauf könnte darauf rückschließen lassen, dass in diesem Fall insbesondere HER2-negative CETCs freigesetzt werden.

Zu (2)

Bei insgesamt 12 der 20 Patientinnen kam es im Verlauf zu mindestens einer Änderung des HER2-Status. Dabei kam es sowohl zu einem Switch/Shift von einem initial HER2-positiven Status zu einem negativen, als auch umgekehrt.

Die Abbildung 23 zeigt die Schwankungsbreite des Anteils HER2-amplifizierter Zellen bei jeweils zwei aufeinanderfolgenden Analysen. Der größte Unterschied zwischen zwei Messungen betrug 70%. Der Median der Schwankungsbreite lag bei 25%. Der durchschnittliche Unterschied zwischen zwei Analysen lag bei 25,8%. Dieser Wert entspricht einer Veränderung des Amplifikationsgrades von etwa 5 (der insgesamt 20 untersuchten) CETCs.

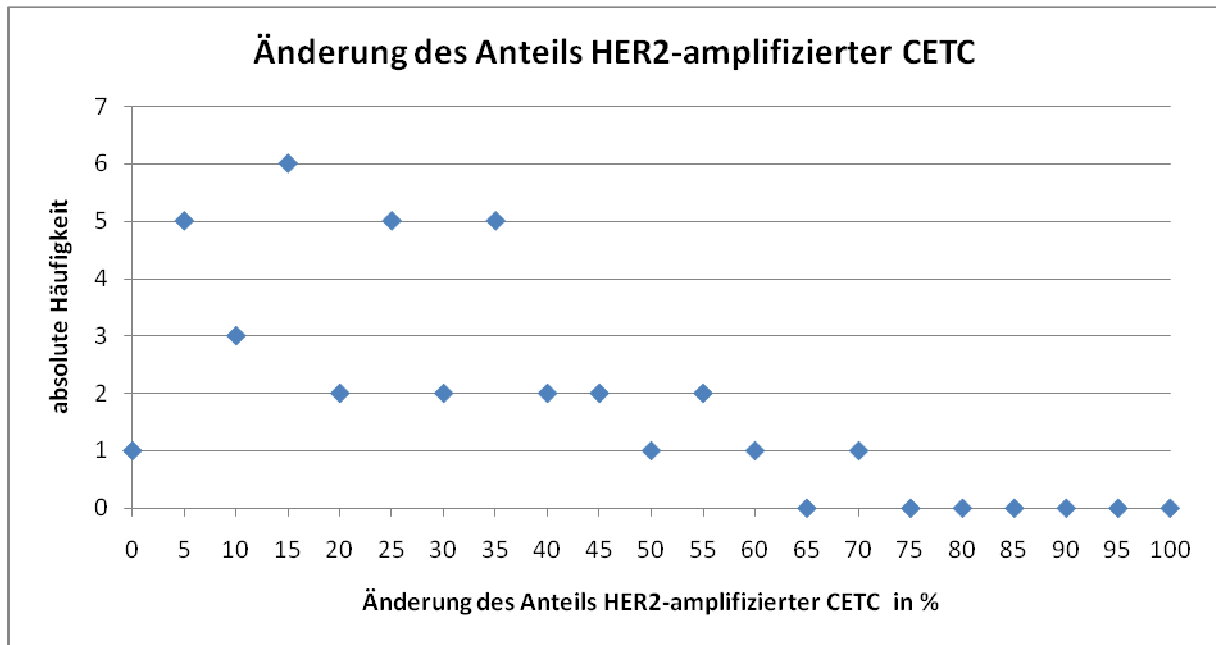


Abb. 23: Darstellung der Häufigkeitsverteilung zur Änderung des Anteils HER2-amplifizierter CETC.

5.3.3 Einzelfallbeobachtungen

5.3.3.1 EpCAM-negative Zelle mit HER2-Amplifikation

Bei einer Patientin fiel beim Auszählen der 20 CETC eine Zelle auf, die weder das typische grün fluoreszierende Käppchen, noch eine starke membranäre Färbung aufwies, aber dennoch hochamplifiziert war (Abb. 24). Diese Beobachtung blieb allerdings ein Einzelfall, trotz der Tatsache das auf solch ein Phänom bei den folgenden Untersuchungen vermehrt geachtet wurde.

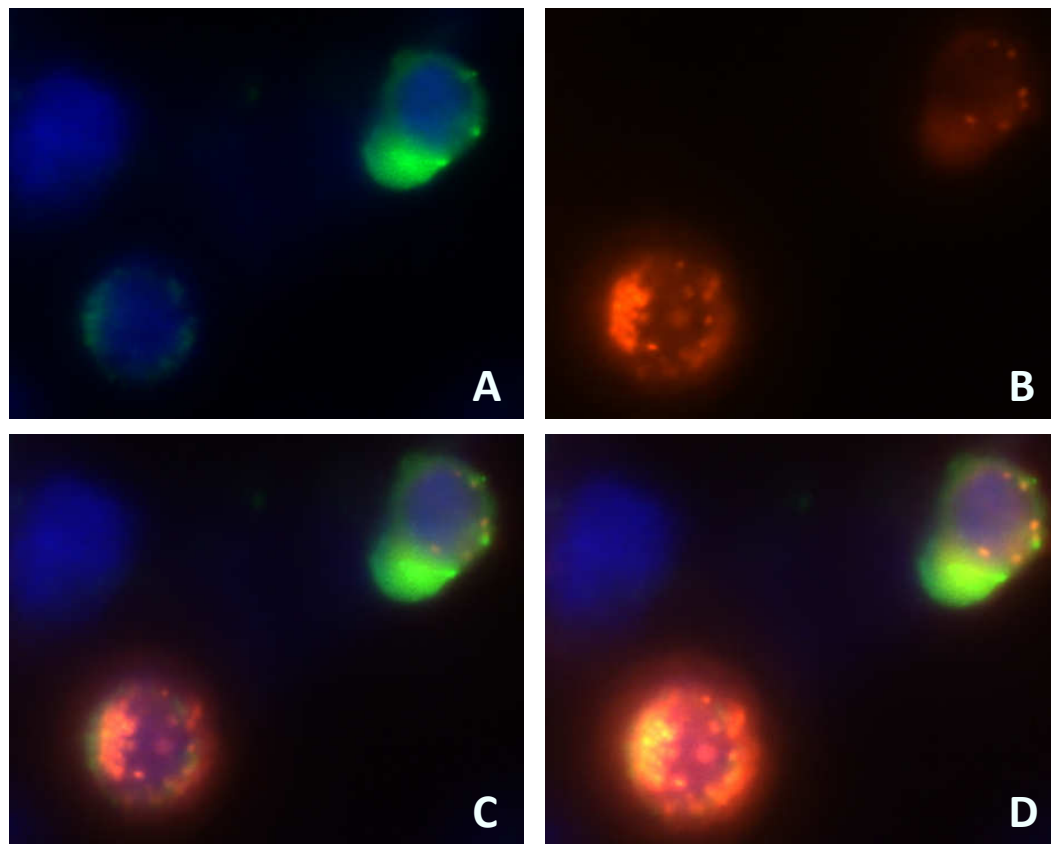


Abb. 24: Darstellung einer EpCAM-negativen Zelle mit HER2-Amplifikation.

(A) zeigt zwei Zellen im Blau-/Grünfilter zur Darstellung der DAPI-Färbung und des EpCAM-FITC-Antikörpers. Jedoch besitzt nur die Zelle oben rechts das charakteristische CAP auf der Zelloberfläche. Die andere Zelle weist nur eine sehr schwache, inhomogene Randfärbung auf und entspricht demnach nicht den Kriterien einer EpCAM-positiven Zelle.

(B) zeigt die gleichen Zellen im Orange-Filter zur Darstellung der HER2-Genamplifikate. Bei der EpCAM-positiven Zelle oben rechts sind sechs deutlich voneinander abgrenzbare Amplifikate zu erkennen. Die EpCAM-negative Zelle unten links zeigt deutlich mehr als 10 Signale. Dabei liegt ein Großteil der HER2-Amplifikate in einem sogenannten Cluster vor, welches typisch für hochamplifizierte Zellen ist. (C) und (D) zeigen beide Zellen bei Überlagerung aller drei Filter. In (D) kommen durch weiteres Durchfokussieren der Zelle weitere Amplifikate zum Vorschein und werden noch kräftiger dargestellt, sodass sich ein Halo-Ring bildet.

5.3.3.2 Polysome CETC

Bei einer weiteren Patientin fiel trotz der Farbinterferenz zwischen Anti-EpCAM-FITC und der ebenfalls grünfluoreszierenden CEP17-Sonde auf, dass der überwiegende Teil der ausgezählten Zellen wahrscheinlich mehr als zwei Chromosomen 17 aufwiesen (Abb. 25). Dabei variierte die Zahl zwischen 2 und über 10 der CEP17-Signalen pro Zelle. 100% der bei dieser Patientin untersuchten CETC waren hochamplifiziert mit überwiegend mehr als 10 HER2-Amplifikaten pro Zelle.

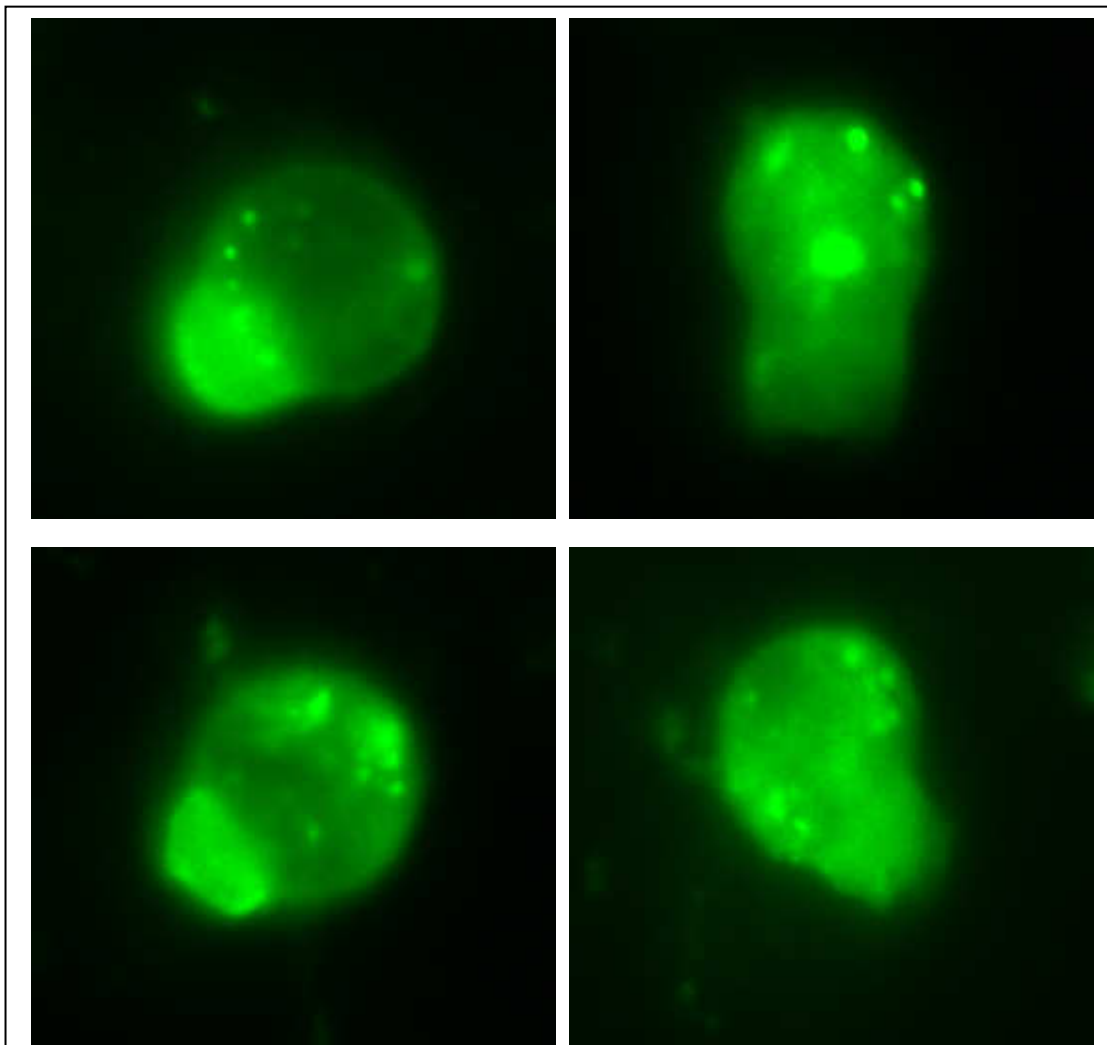


Abb. 25: Darstellung von vier EpCAM-positiven CETC im Grünfilter mit vermutlich mehr als zwei CEP17-Signalen.

6 Diskussion

6.1 Bewertung der Methoden

6.1.1 Bewertung der Methode zur Messung der CETC

Zuerst sollen die Probleme bei der Detektion von zirkulierenden Tumorzellen besprochen und Unterschiede zwischen der MAINTRAC®-Methode und anderen Verfahren aufgezeigt werden. Wie bereits einleitend beschrieben, existiert eine Vielzahl von Techniken zum Nachweis und zur Messung von zirkulierenden Tumorzellen. Dabei haben alle Methoden das Problem, dass bisher kein Tumorzellmarker im eigentlichen Sinne identifiziert werden konnte, d.h. der in allen Zellen eines Karzinoms (Sensitivität) und ausschließlich in vom Tumor abstammenden Zellen exprimiert wird (Spezifität). Daher nutzen die meisten Verfahren andere, sogenannte gewebs- oder epithelspezifischer Antigene.

Allerdings binden epithel-spezifische Antikörper, wie alle Antikörper, auch an bestimmte Epitope, die ebenfalls bei nicht-epithelialen Zellen vorkommen können. Weiterhin wurde die mRNA Expression von Cytokeratinen oder EpCAM in nicht-epithelialen Zellen beschrieben. Dies wird von Leukocyten, Monocyten, Makrophagen, Plasmazellen und kernhaltigen hämatopoetischen Vorläuferzellen berichtet (Allan & Keeney 2010; Allard et al. 2004; Lacroix 2006; Mavroudis 2010; Paterlini-Brechot & Benali 2007; Sleijfer et al. 2007). Dies muss aber nicht mit einer Oberflächenantigenexpression einhergehen. Auch an anderen Stellen wurde eine unspezifische Expression in hämatopoetischen Zellen, die keine epithelialen Antigene exprimieren, beschrieben (Mostert et al. 2009; Paterlini-Brechot & Benali 2007). Außerdem können durch die epithel-spezifischen Antikörper auch immer epitheliale, aber nicht vom Tumor stammende Zellen, erkannt werden, die durch Operationen oder im Rahmen von Entzündungsprozessen und gutartigen proliferativen Erkrankungen in die Blutbahn gelangen können (Paterlini-Brechot & Benali 2007, Camara et al. 2006).

Ein weiteres Problem bei der Messung zirkulierender Tumorzellen stellt die vielfach beschriebene intra- und intertumorale Heterogenität dar (Campbell et al. 2007; Polyak 2008). Das heißt einerseits, dass es selbst innerhalb eines Primärtumors hinsichtlich der Expression bestimmter Markerantigene große Unterschiede zwischen

den Tumorzellen gibt. Auch die Unterschiede zwischen Zellen des Primärtumors und seiner Metastasen können eine Rolle spielen, da die im Blut zirkulierenden Tumorzellen sowohl vom Primärtumor als auch seiner Metastasen stammen können. Andererseits gibt es beim Mammakarzinom auch eine starke interindividuelle Variabilität, sodass sich die Brustkrebserkrankungen verschiedenener Patientinnen in ihrer Zellzusammensetzung stark unterscheiden (Brustkrebssubtypen) (Allred et al. 2008; Polyak 2008; Sieuwerts et al. 2009).

Desweiteren wird die molekulare bzw. genetische Instabilität der Tumorzellen, insbesondere der Erwerb neuer genetischer Aberrationen, als erschwerender Faktor bei der Suche nach einer sensitiven Methode zur Bestimmung zirkulierender Tumorzellen gesehen (Hanahan et al. 2000; Meng et al. 2004; Paterlini-Brechot & Benali 2007; Sieuwerts et al. 2009). Auch die bereits erwähnte „epithelial to mesenchymal transition“, kurz EMT, also der Verlust epithelialer Antigene wie beispielsweise EpCAM zugunsten einer gesteigerten Expression mesenchymaler Antigene im Rahmen des Metastasierungsprozesses, ist eine weitere mögliche Ursache für eine eingeschränkte Sensitivität der meisten existierenden Verfahren (Allan & Keeney 2010; Paterlini-Brechot & Benali 2007; Polyak et al. 2009). Sieuwerts et al. konnte zeigen, dass Brustkrebszellen bestimmter genetischer Subtypen wie der „normal-like“ –Subtyp kaum EpCAM exprimieren und somit durch die CellSearch-Methode nicht angereichert und detektiert werden können. Diese Zelltypen weisen allerdings eine starke Expression der beiden EMT-Marker Vimentin und TWIST1 auf (Sieuwerts et al. 2009) und könnten ein Beleg für die Bedeutung der EMT bei der Unterbewertung der eigentlichen CTC-Zahl sein (falsch-negativ).

Allerdings werden mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode auch Zellen mit minimaler EpCAM Expression erfasst, sodass die bisher höchste Sensitivität erreicht wird.

Dennoch gilt EpCAM neben den Cytokeratinen als am weitesten verbreiteter und akzeptierter Marker zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen, wobei beim Nachweis von Cytokeratin wegen der intrazellulären Lokalisation ein Fixierungsschritt mit den oben erwähnten Problemen der unspezifischen Bindung unabdingbar ist..

Bei den molekularen Techniken kann es durch Kontamination mit normalen Blutzellen und bei der RNA-Extraktion oder durch die Präsenz von Pseudogenen zu falsch-positiven Messungen kommen (Mavroudis 2010). Alle diese genannten Aspekte erschweren eine sichere Detektion von Tumorzellen.

Die CellSearchTM-Methode ist das bisher einzige von der FDA zugelassene Verfahren zur Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen. Die Zulassung ist vor allem auf die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zurückzuführen (Mavroudis 2010; Riethdorf et al. 2007). Dennoch hat dieses Verfahren Schwächen. Infolge von Anreicherungsschritten im Vorfeld der eigentlichen Messung kommt es zum Verlust einer Vielzahl von Zellen, der zu einer Unterbewertung der Zellzahl führt. Pachmann et al. konnte zeigen, dass allein die Verwendung der CellSave®Tubes, die eine Fixationslösung enthalten, zu deutlich niedrigeren Detektionsraten führt als die in dieser Arbeit verwendeten Standardröhrchen (Pachmann et al. 2011). Ein weiteres Problem in diesem Zusammenhang ist die Permeabilisierung der Zellen, die eine nachfolgende (morphologische) Beurteilung der Zellen aufgrund der verloren gegangenen Integrität erschwert (Gerges et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass möglicherweise durch Fixation, Anreicherung und Permeabilisierung meist nur noch kleine Zellfragmente bzw. Mikropartikel auswertbar sind (Coumans et al. 2010; Pachmann et al. 2011). Bei der MAINTRAC®-Methode wird hingegen auf eine Anreicherung verzichtet. Vor der Messung werden lediglich die Erythrocyten lysiert und der Anti-EpCAM-FITC-Antikörper dazugegeben und nur die Membranmarkierung wird anschließend als positiv beurteilt. Diese schonende Aufbereitung hat somit nicht nur höhere Detektionsraten, sondern auch eine bessere Beurteilbarkeit der Zellen bei der Relokalisierung zur Folge, sodass eine zuverlässige Aussage hinsichtlich der Vitalität möglich ist. Auch für die molekulare Charakterisierung der CETCs, wie die HER2-FISH-Analyse, stellt die schonende Aufbereitung einen wesentlichen Vorteil dar, da der Großteil der zirkulierenden Tumorzellen intakt bleibt.

Die beiden Verfahren unterscheiden sich außerdem hinsichtlich der verwendeten Marker. Während bei der MAINTRAC®-Methode ausschließlich EpCAM zur Identifikation der CETC herangezogen wird, erhofft man sich bei dem CellSearch-Verfahren durch eine zusätzliche Verwendung von Antikörpern gegen leukocytenspezifische Antigen CD45 zum Ausschluss von Leukocyten und von Antikörpern gegen Cytokeratine eine höhere Spezifität.

Mit der MAINTRAC®-Methode wurde in einigen Studien die prognostische Bedeutung des CETC-Verlaufes unter verschiedenen Therapien bei Brustkrebs nachgewiesen. Unter anderem wurde mit diesem Verfahren gezeigt, dass ein Anstieg der CETC-Zahl um mindestens das 10fache des Ausgangswertes zum Ende einer adjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit primär nicht metastasiertem

Brustkrebs mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert ist (Pachmann et al. 2008b).

Ursachen eingeschränkter Sensitivität (→falsch negativ)	Ursachen eingeschränkter Spezifität (→falsch positiv)
- intra- und intertumorale Heterogenität	- epitheliale Zellen, die durch Operationen oder im Rahmen von Entzündungen und gutartigen proliferativen Erkrankungen ins Blut gelangen
- genetische Instabilität der Tumorzellen	- nicht-epitheliale Zellen mit aberranter Expression epithelialer Antigene
- EMT (epithelial-to-mesenchymal-transition)	- unspezifische Bindung an Leukocyten
- Anreicherungstechnik insuffizient (insb. Größen- und Dichtegradienten-basierte Verfahren)	- tumor-/gewebsspezifische Marker sind nicht 100%ig organ- oder tumorspezifisch (z.B. HER2 bei Mamma und Magen-Ca)
	- Pseudogene

Tab. 17: Schwierigkeiten bei der Detektion zirkulierender Tumorzellen.

6.1.2 Bewertung der Methode zur Bestimmung des HER2-Status an CETC

Der in der Einleitung dargestellte Testalgorithmus zur Bestimmung des HER2-Status am Gewebe sieht die Immunhistochemie und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als gleichwertige Testverfahren, sodass beide als initiale Diagnostik zur Anwendung kommen können. Allerdings bevorzugen einige Autoren die HER2-FISH-Analyse als initiales Testverfahren, da sie entsprechend der Datenlage besser reproduzierbare und präzisere Ergebnisse liefert (Burandt & Sauter 2010; Sauter et al. 2009; Wolff et al. 2007). Außerdem soll der prädiktive Nutzen für das Ansprechen auf eine Anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab höher sein (Burandt & Sauter 2010). Dieser Vorteil soll auf seltener auftretende und gleichzeitig besser beherrschbare technische Probleme bei der Präparation beruhen (Burandt & Sauter 2010). Beide Verfahren werden an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt. Insbesondere die Dauer und Art der Fixierung scheint ein wesentlicher Grund für Fehlbeurteilungen und Diskrepanzen zwischen den Verfahren zu sein. Sowohl eine Unterfixierung, als auch eine zu lange Fixierung können das Ergebnis verfälschen und insbesondere bei der Immunhistochemie zu falsch-positiven oder falsch-negativen Befunden führen (Burandt & Sauter 2010; Rüschhoff et al. 2009). Doch auch bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung kann es durch Gewebeschädigung infolge der Fixierung dazu kommen, dass das Präparat nicht korrekt auswertbar ist. Fraglich ist, ob hieraus falsche Befunde resultieren (Burandt & Sauter 2010).

Die in dieser Arbeit durchgeführte HER2-FISH-Analyse fand hingegen an initial nicht fixierten zirkulierenden Tumorzellen statt und unterliegt somit nicht der oben beschriebenen Problematik. Dieser Umstand und die Tatsache der schonenden Aufbereitung der Blutproben könnte erklären, warum wir auch kleinere HER2-Gensignale erkennen und daher höhere Amplifikationsraten haben. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass es möglicherweise durch die Gewebefixierung zur Unterdrückung kleinerer Signale bei der FISH-Analyse am Tumorpräparat kommt. Gleichzeitig nutzen wir die oben beschriebenen Vorzüge der FISH-Technik wie höhere Testgenauigkeit, Reproduzierbarkeit und Objektivität. Präparationsfehler, wie sie in neun Fällen vorkamen, wurden problemlos erkannt, da keine Hybridisierung stattgefunden hatte.

Ein weiterer Unterschied zur FISH-Diagnostik am Gewebe besteht darin, dass wir immer normale Blutzellen als Kontrollzellen haben und durch das Durchfokussieren der Zellen in der Lage sind, die Signale in allen Ebenen der Zelle zu finden. Der Pathologe sieht hingegen nur die Gensignale einer Schnittebene.

Ein Nachteil unserer Methode ist jedoch die Überlagerung der Grünfluoreszenz von Anti-EpCAM-FITC und der CEP17 Sonde, sodass beispielsweise Polysomien nicht sicher entdeckt werden können. Deshalb haben wir auch auf die Berechnung der von der ASCO empfohlenen HER2-Ratio, also dem Verhältnis zwischen HER2- und CEP17-Signalen, verzichtet.

Zur Bestimmung des HER2-Status an zirkulierenden Tumorzellen wurden in anderen Studien (siehe Tabelle 18) neben der Fluoreszenz- in-situ-Hybridisierung auch RT-PCR-basierte Verfahren, wie der AdnaTest®, zum Nachweis der HER2-mRNA-Expression sowie der immunfluorimetrische Nachweis der HER2-Expression angewandt. Letzterer wurde in den meisten Studien mit dem CellSearch™-Verfahren zur Anreicherung und Identifikation der CTC kombiniert (Fehm et al. 2010; Munzone et al. 2010; Munzone et al. 2008; Pestrin et al. 2009; Pestrin et al. 2012; Riethdorf et al. 2010).

Beim Vergleich der Verfahren fällt auf, dass wir mit unserer Methode, unter anderem aufgrund fehlender Anreicherungsschritte bei der Probenaufbereitung, deutlich mehr Zellen beurteilen konnten als in anderen Studien zur Bestimmung des HER2-Status an zirkulierenden Tumorzellen.

Insbesondere bei der CellSearch™-basierten Immunofluoreszenz lag der Median der Zahl beurteilter Zellen in einigen Studien bei nur 3 – 7 CTC (Fehm et al. 2010;

Munzone et al. 2010; Munzone et al. 2008; Pestrin et al. 2009). Allerdings konnte Meng et al. in einer Studie auch zeigen dass bereits 10 ausgewertete zirkulierende Tumorzellen zur Beurteilung des HER2-Status mittels FISH ausreichen (Meng et al. 2004). Dennoch sollte in diesem Zusammenhang kritisch bemerkt werden, dass auch bei unserer Methode in 57 Fällen weniger als 20 CETC auf dem Objektträger zu finden waren und somit eine Beurteilung des HER2-Status nach unseren Anforderungen nicht möglich war.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Die meisten Studien zu zirkulierenden Tumorzellen beschäftigen sich mit deren Nachweis und Quantifizierung und untersuchen den prognostischen und prädiktiven Nutzen. Gerade aber die molekulare/genetische Charakterisierung und Phänotypisierung von zirkulierenden Tumorzellen könnte weitere Einblicke in die Biologie der Tumorzellen und in den Metastasierungsprozess liefern sowie neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen, insbesondere, wenn sich die zirkulierenden Tumorzellen hinsichtlich bestimmter Eigenschaften (wie beispielsweise der Expression bestimmter Antigene wie HER2) vom Primärtumor unterscheiden.

In zahlreichen Studien konnten bereits Unterschiede zwischen dem HER2-Status eines Primärtumors und seiner Metastasen nachgewiesen werden (Gancberg et al. 2002; Regitnig et al. 2004; Zidan et al. 2005). Zidan und Kollegen beispielsweise fanden bei 7 (12%) von 58 Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor HER2-positive Metastasen (Zidan et al. 2005). Ähnliches wurde auch bei Vergleichen von Primärtumoren mit den entsprechenden disseminierten Tumorzellen im Knochenmark gezeigt (Becker et al. 2005; Braun et al. 2001; Krishnamurthy 2012; Solomayer et al. 2006). Da einerseits Metastasen einer Biopsie nicht immer zugänglich sind und andererseits die (Re-)Evaluation des HER2-Status an Metastasen bzw. an DTC des Knochenmarks generell mit invasiven (risikobehafteten, schmerzhaften) Eingriffen verbunden ist, hat man versucht den HER2-Status auch an zirkulierenden Tumorzellen zu bestimmen (Čabiňáková et al. 2012). Tabelle 18 zeigt eine Auswahl bisher veröffentlichter Studien zur HER2-Diagnostik an zirkulierenden Tumorzellen.

Hauptziel dieser Arbeit war es zu analysieren, ob wir mit unserer Methode HER2-amplifizierte zirkulierende Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem

Primärtumor finden. Dabei kamen wir zu dem Ergebnis, dass bei allen 56 Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor mindestens eine CTC mit 6 oder mehr HER2-Amplifikaten gefunden wurde. Entsprechend unserer Grenzwertdefinition, die sich an den Leitlinien zur Auswertung der HER2-FISH-Analyse orientiert und wonach ein positiver HER2-Status vorliegt, wenn mehr als 50% der Tumorzellen mindestens 6 HER2-Amplifikate aufweisen, waren letztendlich 32 Patientinnen (57,1%) als HER2-positiv einzustufen.

Die Ergebnisse verschiedener in Tabelle 18 dargestellter Studien zu dieser Fragestellung zeigen eine starke Schwankung zwischen 7% und 53% hinsichtlich des Vorhandenseins HER2-positiver zirkulierender Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass einerseits verschiedene Verfahren angewandt wurden und andererseits unterschiedliche Definitionen für eine HER2-Positivität verwendet wurden. Fehm et al. beispielsweise klassifizierte eine Patientin als HER2-positiv, wenn insgesamt mindestens 5 CTC gefunden wurden und davon mindestens eine CTC eine starke HER2-Expression aufwies (Fehm et al. 2010). Bei den Arbeiten von Pestrin et al. wurden Fälle als HER2-positiv bezeichnet/eingestuft, wenn mindestens 2 CTC gefunden wurden und mindestens 50% dieser Zellen eine starke HER2-Expression aufwiesen (Pestrin et al. 2009; Pestrin et al. 2012).

Für das Vorhandensein von HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor gibt es in der Literatur verschiedene Erklärungsansätze.

Eine mögliche Ursache ist die intratumorale HER2-Heterogenität bzw. die genetische HER2-Heterogenität des Primärtumors. Erstere ist allgemein definiert als regionale Variation des HER2-Status (HER2-Proteinexpression oder Genamplifikation) in Tumorzellen des gleichen Karzinoms (Ohlschlegel et al. 2010). Von genetischer HER2-Heterogenität wird hingegen gesprochen, wenn mehr als 5% und weniger als 50% der Tumorzellen eine HER2-Ratio $\geq 2,2$ aufweisen (Vance et al. 2009). Es werden in der Literatur wiederum zwei Hypothesen diskutiert, wie es zu dieser Variabilität der Tumorzellen eines Primärtumors kommt. Die sogenannte Krebsstammzellhypothese besagt, dass eine kleine Gruppe von Tumorzellen mit stammzell-ähnlichen Eigenschaften, wie Selbstregeneration, autonome Proliferation, Apotoseresistenz und Differenzierung, für die Tumorinitiation, -progression und -

metastasierung sowie für Therapieresistenzen mit der Folge von Rezidiven verantwortlich ist (Campbell & Polyak 2007). Die Heterogenität des Tumors ist auf die unterschiedliche Differenzierung der aus den Krebsstammzellen hervorgehenden Tumorzellen zurückzuführen.

Die zweite Theorie, das sogenannte klonale Entwicklungsmodell, geht dagegen davon aus, dass die Tumorerkrankung auf eine „normale“ Zelle zurückzuführen ist, die verschiedene Mutationen erworben hat und hierdurch einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen besitzt (Campbell & Polyak 2007; Nowell 1976; Wolman 1986). Durch genetische Instabilität und ungehemmte Proliferation dieser Zellen kommt es zu weiteren Mutationen, sodass eine Vielzahl von Subpopulationen entstehen, die zur Heterogenität des Primärtumors führen (Campbell & Polyak 2007; Hanahan & Weinberg 2000). Entsprechend dieser Theorie ist jede Zelle potentiell in der Lage stammzellähnliche Eigenschaften zu erwerben und in Abhängigkeit von den erworbenen Mutationen zu metastasieren und Resistenzen gegenüber Therapien zu entwickeln (Campbell & Polyak 2007; Merlo et al. 2006; Nowell 1976).

In diesem Zusammenhang soll auch noch einmal ausdrücklich betont werden, dass ein negativer HER2-Status nicht bedeutet, dass der Primärtumor keine Zellen mit HER2-Überexpression oder Amplifikation aufweist. Nach dem immunhistochemischen DAKO-Score dürfen sogar bis zu 30% der Tumorzellen den HER2-Rezeptor überexprimieren und der Tumor wird dennoch als HER2-negativ bezeichnet. Daher scheint es nur logisch zu sein, dass auch bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor HER2-positive zirkulierende Tumorzellen gefunden werden. Es konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden, dass Patientinnen mit einem höheren immunhistochemischen Score auch einen höheren Anteil HER2-amplifizierter Zellen besitzen.

Der Erwerb der HER2-Amplifikation erst im Rahmen der Metastasierung oder zu einem noch späteren Zeitpunkt scheint ein weiterer möglicher Grund für zirkulierende Tumorzellen mit einer HER2-Amplifikation trotz eines Her2-negativen Primärtumors zu sein (Pestrin et al. 2012). Dafür spricht beispielsweise, dass sich der HER2-Status auch zwischen verschiedenen Metastasen eines Primärtumors unterscheiden kann. (Gancberg et al. 2002; Pestrin et al. 2012; Čabiňáková & Tesařová 2012). Unter dem Selektionsdruck verschiedener Therapien könnte es dazu kommen, dass ein Subklon

dominant wird, weitere Mutationen wie z.B. die HER2-Amplifikation erwirbt und eventuell auch Resistenzen gegen verschiedene Therapien entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem überprüft, ob es Zusammenhänge zwischen dem HER2-Status der zirkulierenden Tumorzellen und verschiedenen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms gibt. Dabei zeichnete sich zumindest ein Trend dahingehend ab, dass eine einseitige statistisch signifikante Korrelation mit dem Metastasierungsstadium vorlag, sodass Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung häufiger HER2-positive CTC aufwiesen. Dennoch waren auch Patientinnen mit nicht-metastasiertem Brustkrebs in 48,7% der Fälle als HER2-positiv einzustufen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Ignatiadis und Wülfing, die in ihren Studien bei nicht metastasiertem Brustkrebs in 41,7 % bzw. 50,1 % der Fälle HER2-positive zirkulierende Tumorzellen fanden (Ignatiadis et al. 2011; Wülfing et al. 2006). Hinsichtlich anderer Prognosefaktoren wie dem Hormonrezeptorstatus oder dem histologischen Grading konnten in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Zusammenhänge gezeigt werden.

Auch Apostolaki et al. konnte in zwei Arbeiten keine Korrelationen zwischen dem HER2-Status zirkulierender Tumorzellen und verschiedenen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms finden (Apostolaki et al. 2009; Apostolaki et al. 2007).

Wülfing et al. untersuchte ebenfalls die Korrelation zu verschiedenen Prognosefaktoren. Dabei konnten statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein HER2-positiver CTC und einem negativen (Östrogenrezeptor-) ER-Status sowie einem höheren histologischen Tumorgrad nachgewiesen werden (Wülfing et al. 2006). Gegensätzliches hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus wurde in einer Studie von Munzone et al. beschrieben, wonach alle Patientinnen mit HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen einen positiven Hormonrezeptorstatus besaßen (und im Vorfeld neben einer Chemotherapie auch eine endokrine Therapie erhielten) (Munzone et al. 2010). Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung war jedoch auffallend, dass insbesondere triple-negative Patientinnen scheinbar häufiger HER2-positiv waren (6 von 8 Patientinnen; 75%). (8 von 10 ER-waren HER2+). Aufgrund der zu geringen Patientenzahl kann jedoch nur ein Trend aufgezeigt werden.

Desweiteren wurden insgesamt 20 Patientinnen im Verlauf mehrfach untersucht. Die Auswertung dieser Wiederholungsmessungen erfolgte unter Berücksichtigung der im Scan[^]R ermittelten CETC-Zahlen. Es konnten sowohl inverse als auch gleichsinnige Verläufe zwischen CETC-Zahl und dem Anteil HER2-amplifizierter CETC gezeigt werden.

Außerdem änderte sich der HER2-Status bei 12 von 20 Patientinnen unter verschiedenen Chemo- oder Hormontherapien. Dabei waren sowohl ein Shift von einem negativen zu einem positiven HER2-Status, als auch umgekehrt möglich.

Dass ein Anstieg der CETC-Zahl um mindestens das Zehnfache des Ausgangswertes zum Ende einer adjuvanten Chemotherapie mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergeht, konnte für unsere Methode bereits gezeigt werden (Pachmann et al. 2008a). Auch war gezeigt worden, dass ein Abfall der CETC-Zahl unter einer neoadjuvanten Chemotherapie mit dem Therapieansprechen des Tumors korreliert (Pachmann et al. 2005a). Um allerdings zu sagen, ob die Beobachtung der Kinetik HER2-amplifizierter Zellen geeignet ist, das Therapieansprechen zu prognostizieren bedarf es einer längeren Beobachtungszeit und eines größeren Patientenkollektivs. Auf die aktuelle Studienlage zur Bedeutung der Erfassung HER2-amplifizierter Zellen für das Therapiemonitoring wird im nachfolgend näher eingegangen.

Bei einer Patientin war eine EpCAM-negative beziehungsweise nur schwach positive zirkulierende Tumorzelle mit einer HER2-Amplifikation nachweisbar. Ähnliches wurde auch in mehreren Studien zur OncoCEE-Plattform der Firma Biocept beschrieben. Dort fand man Cytokeratin-negative CTC, die ebenfalls eine HER2-Amplifikation aufwiesen (Krishnamurthy 2012; Krishnamurthy et al. 2010; Mayer et al. 2011; Mikolajczyk et al. 2011).

Zellen mit verminderter oder fehlender EpCAM-Expression könnten ein Korrelat der bereits erwähnten „epithelial to mesenchymal transition“ (EMT) sein, die wahrscheinlich ein wesentlicher Schlüssel des Metastasierungsprozesses ist. Durch den Verlust epithelialer Antigene und Eigenschaften und den gleichzeitigen Erwerb mesenchymaler Charakteristika kommt es zur Verringerung der Zell-Zell-Adhäsion, zur Steigerung der Zellmotilität, sowie zur Degradation des Umgebungsgewebes mit der Folge einer gesteigerten Invasivität dieser Zellen (Bonnomet et al. 2010). Desweiteren soll die EMT zu einer gesteigerten Apoptoseresistenz der zirkulierenden

Tumorzellen beitragen. Außerdem soll sie den Zellen ermöglichen eine Neoangiogenese, die unter anderem für das Metastasenwachstum wichtig ist, zu induzieren (Bonnomet et al. 2010). Um auch diese Zellen mit reduzierter oder gar fehlender Expression von epithelialen Markern wie EpCAM oder Cytokeratin zu detektieren, könnte eine parallele HER2-Bestimmung hilfreich sein.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die einzelnen Brustkrebssubtypen hinsichtlich der EpCAM-Expression unterscheiden (Sieuwerts et al. 2009). Beispielsweise der „normal-like“-Subtyp scheint EpCAM kaum oder gar nicht zu exprimieren und entginge in den anderen methodischen Ansätzen ebenfalls der Detektion mit Anti-EpCAM-Antikörpern. Auch für diese Fälle scheint eine parallele Bestimmung der HER2-Amplifikation bzw. Überexpression sinnvoll. Auch mit der Bestimmung des HER2-Status an zirkulierenden Tumorzellen erreicht man keine 100%ige Sensitivität, da auch nicht jede zirkulierende Tumorzelle den HER2-Rezeptor überexprimiert.

Bei einer weiteren Patientin lag die Vermutung auf das Vorliegen einer Polysomie 17 nahe. Derzeit gibt es keine einheitliche Definition, ab wann man von einer Polysomie sprechen kann (Gaiser et al. 2012). Eine weithin akzeptierte Definition ist, dass das Verhältnis aus Centromer 17-Signalen und der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen mindestens 3 betragen muss ($\text{CEP17/Zellzahl} \geq 3$).

Dieses Verhältnis konnte jedoch aufgrund der Interferenz der grünfluoreszierenden CEP17-Sonde und dem ebenfalls grün leuchtendem EpCAM-FITC-Antikörper nicht zuverlässig gebildet werden, sodass nur die Vermutung auf eine Polysomie geäußert werden kann. In mehr als 50% der Zellen waren dennoch 5 bis 10 CEP17-Signale abgrenzbar. Außerdem waren in allen Zellen mindestens 6 HER2-Genamplifikate nachweisbar. Insgesamt 14 Zellen hatten sogar mehr als 10 Amplifikate. Damit lag das CEP17/Zellzahl-Verhältnis über 3 und auch die FISH-Ratio war $>2,2$.

Die Angaben zur Häufigkeit des Auftretens einer Polysomie 17 schwanken in der Literatur zwischen 3 % und 78 % (Gaiser et al. 2012; Rüschhoff et al. 2009). Allerdings erlauben die gebräuchlichen Testkits zur Durchführung einer Zweifarben-ISH eigentlich nur die Aussage, dass eine Koamplifikation der Centromerregion von Chromosom 17 vorliegt. Eine Vervielfältigung des gesamten Chromosoms 17 kann daher nicht sicher belegt werden. Dieser Aspekt ist von Bedeutung, da in einer

Studie gezeigt werden konnte, dass in nur 14% eine tatsächliche Polysomie des gesamten Chromosoms vorlag (Gaiser et al. 2012; Tse et al. 2011).

Hayashi et al. bestimmte die Polysomie 17-Rate in zirkulierenden Tumorzellen und kam zu dem Schluss, dass eine Polysomie 17 nur sehr selten in zirkulierenden Tumorzellen nachzuweisen ist und meist Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor betrifft (Hayashi et al. 2011). Diese Ergebnisse stützen somit den Befund dieser Arbeit.

Eine weitere Frage, die sich in diesem Kontext stellt, ist die nach der Bedeutung der Polysomie 17 für das Ansprechen auf eine Anti-HER2-Therapie. Bempt et al. konnte zeigen, dass eine Polysomie 17 nicht zwangsläufig mit einer Amplifikation der HER2-mRNA assoziiert war und damit auch nicht unbedingt eine HER2-Überexpression zur Folge hatte (Vanden Bempt et al. 2008). Auch Gaiser et al. geht davon aus, dass nur rund 30% aller polysomen Fälle mit einer HER2/CEP17-Ratio $> 2,2$ und einem immunhistochemisch positivem Befund assoziiert sind. Somit gelten nur diese Patientinnen als potentielle Responder auf eine Anti-HER2-Therapie. Die Mehrzahl der Patientinnen ($> 60\%$) haben aber sowohl entsprechend der FISH-Ratio, als auch in der Immunhistochemie einen grenzwertigen oder gar negativen Befund und sprechen wahrscheinlich nicht auf eine Trastuzumab oder Lapatinibtherapie an (Gaiser et al. 2012; Vanden Bempt et al. 2008). Die Bedeutung der Polysomie 17 ist allerdings bis dato nicht abschließend geklärt und erfordert weitere Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich der Indikationsstellung einer Anti-HER2-Therapie.

6.3 Ausblick

Die Bedeutung der Bestimmung des HER2-Status an zirkulierenden Tumorzellen liegt nicht nur in der Möglichkeit zu einer nicht-invasiven Real-Time-Biopsie, sondern könnte auch in Abhängigkeit vom Resultat der Untersuchung neue Therapieoptionen eröffnen. Insbesondere der Nachweis HER2-positiver zirkulierender Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor könnte zum Einsatz einer Anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®) oder Lapatinib führen. Hierzu wurden bisher allerdings nur wenige Daten veröffentlicht. Unter anderem die Arbeitsgruppe von Meng et al. berichtete von Patientinnen, die in der genannten Situation im metastasierten Stadium Trastuzumab erhielten (Meng et al. 2004). Dabei konnten sowohl ein komplettes als auch zumindest partielle Therapieansprechen verzeichnet

werden. In einer anderen Studie blieb die Therapie mit Lapatinib bei Patientinnen mit überwiegend HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen weitestgehend wirkungslos, wobei sich alle Patientinnen in einem sehr fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befanden und mindestens vier verschiedene Vortherapien erhalten haben. Lediglich bei einer Patientin kam es zu einer vorübergehenden Stabilisierung der Erkrankung (Pestrin et al. 2012).

In weiteren drei Studien erhielten Patientinnen mit fortgeschrittenem und bereits metastasiertem Mammakarzinom als letzte Option unabhängig vom HER2-Status des Primärtumors, seiner Metastasen oder der zirkulierenden Tumorzellen Lapatinib als Monotherapie oder in Kombination mit Paclitaxel (Burstein et al. 2008; Di Leo et al. 2008; Finn et al. 2009), ohne Nachweis eines Nutzens einer Lapatinib-Monotherapie.

Paik et al. veröffentlichte wiederum Ergebnisse einer Studie mit 1787 Brustkrebspatientinnen, in der gezeigt werden konnte, dass auch einige Patientinnen (174) mit HER2-negativem Primärtumor von einer Trastuzumabbehandlung profitierten (Paik et al. 2008).

Mit der DETECT-III-Studie und dem SUCCESS-C-Trial laufen derzeit zwei deutsche Studien, die die Bedeutung HER2-positiver zirkulierender Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor weiter untersuchen sollen (Studienprotokolle).

Ein weiterer Nutzen der HER2-Bestimmung an zirkulierenden Tumorzellen könnte im Therapiemonitoring liegen, da möglicherweise, anhand des Verlustes der HER2-Amplifikation oder - Expression auf zirkulierenden Tumorzellen, das Ansprechen auf eine Chemo-/ Anti-HER2-Therapie beobachtet werden kann (Fehm et al. 2010; Meng et al. 2004; Munzone et al. 2010; Pestrin et al. 2009; Riethdorf et al. 2010).

Meng konnte zeigen, dass insbesondere HER2-positive CTC durch die Therapie mit Trastuzumab eliminiert wurden (Meng et al. 2004).

Bei einigen Patientinnen mit HER2-positivem Primärtumor waren im Anschluss an eine Chemotherapie oder Trastuzumabbehandlung ausschließlich HER2-negative CTC nachweisbar waren (Meng et al. 2004; Munzone et al. 2010; Pestrin et al. 2009). Dies könnte ebenfalls als Indiz für das Ansprechen auf die Therapie gewertet werden.

In einer weiteren Studie erhielten Brustkrebspatientinnen im Stadium 1-4 mit überwiegend HER2-negativem Primärtumor und nach Beendigung der

Standardchemotherapie Trastuzumab. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass im Vorfeld der Trastuzumabbehandlung der überwiegende Teil der nachgewiesenen CK19-mRNA-positiven zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen HER2-positiv war. Andererseits waren nach Trastuzumabbehandlung kaum noch CK19-mRNA-positive CTC oder DTC nachweisbar (Bozionellou et al. 2004). Diese Studie betont nicht nur den Nutzen der HER2-Bestimmung auf zirkulierenden Tumorzellen für die Indikationsstellung einer Anti-HER2-Therapie, sondern auch die Bedeutung für die Therapieüberwachung. Apostolaki et al. wies außerdem nach, dass auch eine adjuvante Chemotherapie in der Lage ist, HER2-mRNA-positive CTC zu eliminieren (Apostolaki et al. 2007).

Desweiteren scheint der Nachweis von HER2-amplifizierten Tumorzellen im Blut eine prognostische Aussagekraft zu besitzen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Patientinnen mit HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen ein kürzeres rezidivfreies und Gesamtüberleben hatten (Apostolaki et al. 2009; Apostolaki et al. 2007; Hayashi et al. 2012; Munzone et al. 2010; Wülfing et al. 2006).

Um den Nutzen der Phänotypisierung bzw. molekularen Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen abschließend zu bewerten, bedarf es weiterer Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven.

Autor	Untersuchte Tumorstadien	Zahl der untersuchten Patientinnen mit C(E)TC und HER2-negativem Primärtumor	Zahl der Patientinnen mit HER2-positiven C(E)TC (absolut/ %)	Methode zur HER2-Evaluation	Bemerkungen
(Meng et al. 2004)	MBC	24	9 / 37,5%	FISH / (Immunofluoreszenz)	Patientinnen mit Rezidiv oder Progress
(Munzone et al. 2010)	MBC	42 (Ausgangsmessung) 45 (unter Therapie)	6 / 14% 8 / 18%	Immunofluoreszenz (Tumor Phenotyping Reagent)	alle Pat. mit HER2+ CTC waren HR+ und hatten ein kürzeres PFS
(Munzone et al. 2008)	MBC	22	6 / 27%	Immunofluoreszenz (Tumor Phenotyping Reagent)	unter/nach ChT
(Fehm et al. 2007)	MBC	12	4 / 33%	RT-PCR (Adna-Test) und/oder slide-based-Assay mit Immunfluoreszenz und FISH	außerdem Messung erhöhter Serum HER2-EZD-Level bei 12/53 Pat. (23%)
(Fehm et al. 2010)	MBC	78 (IF-Messung) 57 (RT-PCR)	25 / 32% 28 / 49%	Immunofluoreszenz (Tumor Phenotyping Reagent) und/oder RT-PCR (Adna-Test)	
(Riethdorf et al. 2010)	M0 BC (PBC)	26 (vor neoadj. Therapie) 11 (nach neoadj. Therapie)	5 / 19,2% 3 / 27,3%	Immunofluoreszenz (Tumor Phenotyping Reagent)	starke IF-Färbung nur in duktales Ca's und hohen T-Stadien
(Ignatiadis et al. 2007a)	M0 BC (PBC)	52	28 / 53,8%	RT-PCR	vor Beginn einer Systemtherapie
(Ignatiadis et al. 2008)	M0 BC (PBC)	124	38 / 30,6%	RT-PCR	

(Ignatiadis et al. 2011)	M0 BC (PBC) MBC	12 33	5 / 41,7% 13 / 39,4%	Immunofluoreszenz (Tumor Phenotyping Reagent)	
(Wülfing et al. 2006)	M0 BC (PBC)	24	12 / 50%	Immunofluoreszenz	Pat. mit HER2+ CTC hatten kürzeres DFS und OS
(Krishnamurthy 2012)	M0 BC (PBC)	57	4 / 7%	FISH	10/47 Pat. (21%) hatten HER2+ DTC
(Hayashi et al. 2012)	MBC	33	8 / 24,2%	Immunofluoreszenz (Tumor Phenotyping Reagent)	Patientinnen mit HER2+ CTC hatten kürzeres PFS und OS
(Pestrin et al. 2009)	MBC	28	8 / 29%	Immunofluoreszenz (Tumor Phenotyping Reagent, Immunicon®)	alle 8 Pat. hatten ≥ 50% HER2+ CTC
(Pestrin et al. 2012)	MBC	96	31 / 32,3%	Immunofluoreszenz (Tumor Phenotyping Reagent) /FISH	7 / 96 Pat. (7,3%) hatten ≥ 50% HER2+ CTC und wurden mit Lapatinib behandelt
(Tewes et al. 2009)	gemischte Stadien	17	5 / 29%	RT-PCR (Adna-Test)	
(Apostolaki et al. 2007)	M0 BC (PBC)	187	40 / 21,4%	RT-PCR	vor und nach Chemotherapie
(Apostolaki et al. 2009)	M0 BC (PBC)	188	47 / 25%	RT-PCR	vor Chemotherapie; Pat. mit HER2-mRNA+ CTC hatten kürzeres DFS und OS

Tab. 18: Studien zum Nachweis von HER2-positiven CTC/DTC bei HER2-negativem Primärtumor.

7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob man im Blut von Patientinnen mit HER2-negativem Brustkrebs im Stadium I bis IV, HER2-positive zirkulierende Tumorzellen nachweisen kann. Hierzu wurde die bereits etablierte MAINTRAC®-Methode zur Detektion zirkulierender Tumorzellen mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis der HER2-Genkopienzahl kombiniert.

In Bezug auf die Zielstellungen der Arbeit ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- 1) Es konnten HER2-positive zirkulierende Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor in einer relevanten Zahl nachgewiesen werden.
- 2) Dabei bestanden keine signifikanten Zusammenhänge zur gemessenen CETC-Zahl und zu anerkannten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms, wie dem Metastasierungsstadium, dem histologischen Grading sowie dem Hormonrezeptorstatus.
- 3) Der HER2-Status der CETC kann sich unter verschiedenen Therapien ändern. Hierbei wurde gezeigt, dass sich der Anteil HER2-positiver CETC gleichsinnig oder invers zur gemessenen Gesamt-CETC-Zahl ändern kann.

Diese Ergebnisse zeigen, dass möglicherweise mehr Patientinnen HER2-positive CETC besitzen als bisher angenommen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liegen über den bisher veröffentlichten Zahlen zu HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor, da möglicherweise die Sensitivität aufgrund methodischer Unterschiede zu anderen Verfahren höher ist. Vergleichbare Studien, die ebenfalls die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis der HER2-Genamplifikation nutzten, zeigten deutlich geringere Positivitätsraten zwischen 7 und 37,5%. Desweiteren beruht die eingeschränkte Vergleichbarkeit zu anderen Studien auf unterschiedlichen Grenzwertdefinitionen.

Dennoch könnten die Ergebnisse wegweisend für den erweiterten Einsatz von Anti-HER2-Therapien bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor sein. Weiterhin könnten durch die Reevaluation des HER2-Status der CETC im Verlauf auch Aussagen über das Ansprechen auf eine Therapie getroffen werden. Hierzu bedarf es allerdings weiterer großer Untersuchungen.

8 Literaturverzeichnis

- Allan AL, Keeney M. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic. *J Oncol* 2010; 2010:426218.
- Allard WJ, Matera J, Miller MC et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6897-904.
- Allred DC, Wu Y, Mao S et al. Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. *Clin Cancer Res* 2008; 14:370-8.
- Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997; 410:83-6.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK et al. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50:197-263.
- Apostolaki S, Perraki M, Kallergi G et al. Detection of occult HER2 mRNA-positive tumor cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic relevance. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117:525-34.
- Apostolaki S, Perraki M, Pallis A et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol* 2007; 18:851-8.
- Arpino G, Weiss H, Lee AV et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1254-61.
- Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 2007; 96:417-23.
- Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH et al. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* 1998; 18:4833-43.
- Balzar M, Briaire-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA et al. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol* 2001; 21:2570-80.
- Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ et al. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* 1999; 77:699-712.
- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; 319:226-30.

Barok M, Isola J, Pályi-Krekk Z et al. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:2065-72.

Baselga J, Albanell J, Molina MA et al. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol* 2001; 28:4-11.

Baulida J, Kraus MH, Alimandi M et al. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 1996; 271:5251-7.

Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T et al. Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients. *Anticancer Res* 2005; 25:2171-5.

Berchuck A, Kamel A, Whitaker R et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990; 50:4087-91.

Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB et al. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* 2005; 65:2378-86.

Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL et al. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene* 1995; 159:11-8.

Bodmer A, Castiglione M. Mammakarzinom im Frühstadium: St. Gallen Konsensus 2011 - Neue Erkenntnisse und Kontroversen in der Behandlung. In: Schweizer Zeitschrift für Onkologie 2011; 3:17-21.

Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15:261-73.

Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:8185-94.

Braun S, Naume B. Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol* 2005; 23:1623-6.

Braun S, Schlimok G, Heumos I et al. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61:1890-5.

Brown RW, Allred CD, Clark GM et al. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2:585-92.

Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2001; 27:137-42.

- Burandt E, Sauter G. [HER2 ASCO guidelines. The answer to everything?]. *Pathologe* 2010; 31 Suppl 2:285-91.
- Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 1997; 18:847-55.
- Burstein HJ, Storniolo AM, Franco S et al. A phase II study of lapatinib monotherapy in chemotherapy-refractory HER2-positive and HER2-negative advanced or metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2008; 19:1068-74.
- Böcker W, Decker T. Pathologie des invasiven Mammakarzinoms. *Der Onkologe*, Springer-Verlag 2008; 14:pp 443-53.
- Camara O, Kavallaris A, Nöschel H, Rengsberger M, Jörke C, Pachmann K. Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells. *World J Surg Oncol* 2006; 4:67.
- Camirand A, Lu Y, Pollak M. Co-targeting HER2/ErbB2 and insulin-like growth factor-1 receptors causes synergistic inhibition of growth in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Med Sci Monit* 2002; 8:BR521-6.
- Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 2007; 6:2332-8.
- Carney WP, Leitzel K, Ali S et al. HER-2/neu diagnostics in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9:207.
- Carraway KL, Cantley LC. A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 1994a; 78:5-8.
- Carraway KL, Price-Schiavi SA, Komatsu M et al. Muc4/sialomucin complex in the mammary gland and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6:323-37.
- Carraway KL, Sliwkowski MX, Akita R et al. The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994b; 269:14303-6.
- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63:181-7.
- Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:14608-13.
- Cho HS, Mason K, Ramyar KX et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; 421:756-60.
- Chong JM, Speicher DW. Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J Biol Chem* 2001; 276:5804-13.

- Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004; 9:606-16.
- Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003; 284:54-65.
- Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:505-16.
- Citron ML, Berry DA, Cirincione C et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003; 21:1431-9.
- Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 1988; 15:20-5.
- Coumans FA, Doggen CJ, Attard G et al. All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 2010; 21:1851-7.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:781-91.
- Cristofanilli M, Reuben J, Uhr J. Circulating tumor cells in breast cancer: fiction or reality? *J Clin Oncol* 2008; 26:3656-7; author reply 7-8.
- Crohns C, Bauerschlag D, Maas N. Endokrine Therapie des Mammakarzinoms - Neue Entwicklungen. *Der Gynäkologe* 3 2009; 42:164-9.
- Delord JP, Allal C, Canal M et al. Selective inhibition of HER2 inhibits AKT signal transduction and prolongs disease-free survival in a micrometastasis model of ovarian carcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16:1889-97.
- Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z et al. Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first-line treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:5544-52.
- DiGiovanna MP, Chu P, Davison TL et al. Active signaling by HER-2/neu in a subpopulation of HER-2/neu-overexpressing ductal carcinoma in situ: clinicopathological correlates. *Cancer Res* 2002; 62:6667-73.
- Ditsch N, Kahlert S, Lenhard M et al. Immunologische Therapie beim Mammakarzinom. *Der Onkologe* 2006; 12:945-54.
- Dittrich C, Steiger D. state of the art - Targeted Therapies in der Onkologie. Österreichische Ärztezeitung. 20. Verlagshaus der Ärzte - Gesellschaft für Medienproduktion und Kommunikationsberatung GmbH; Wien 2007:38-48.

Edwards DP, Grzyb KT, Dressler LG et al. Monoclonal antibody identification and characterization of a Mr 43,000 membrane glycoprotein associated with human breast cancer. *Cancer Res* 1986; 46:1306-17.

Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S et al. Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status. *Breast Cancer Res* 2007; 9:R74.

Fehm T, Müller V, Aktas B et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124:403-12.

Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127:2893-917.

Finn RS, Press MF, Dering J et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and epidermal growth factor receptor expression and benefit from lapatinib in a randomized trial of paclitaxel with lapatinib or placebo as first-line treatment in HER2-negative or unknown metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:3908-15.

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52:1551-7.

Fisher B, Redmond C, Fisher ER et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6:1076-87.

Fleishman SJ, Schlessinger J, Ben-Tal N. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:15937-40.

Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF et al. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 2004; 5:317-28.

Gaglia P, Bernardi A, Venesio T et al. Cell proliferation of breast cancer evaluated by anti-BrdU and anti-Ki-67 antibodies: its prognostic value on short-term recurrences. *Eur J Cancer* 1993; 29A:1509-13.

Gaiser T, Rüschoff J, Moll R. [In situ hybridization in clinical pathology : Significance of polysomy 17 for HER2 determination and genetic tumor heterogeneity in breast cancer]. *Pathologe* 2012; 33 Suppl 2:307-10.

Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F et al. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 2002; 13:1036-43.

Garratt AN, Ozcelik C, Birchmeier C. ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13:80-6.

Garrett TP, McKern NM, Lou M et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 11:495-505.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) (2012) Atlas der Krebsinzidenz und –mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas) [Datenlieferung: Dezember 2012, letzter Aufruf am 27.10.2013] URL: www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID.

Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull* 2010; 94:49-64.

Giai M, Roagna R, Ponzzone R et al. Prognostic and predictive relevance of c-erbB-2 and ras expression in node positive and negative breast cancer. *Anticancer Res* 1994; 14:1441-50.

Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res* 2003; 63:3805-11.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009; 20:1319-29.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22:1736-47.

Goodale D, Phay C, Brown W et al. Flow cytometric assessment of monocyte activation markers and circulating endothelial cells in patients with localized or metastatic breast cancer. *Cytometry B Clin Cytom* 2009a; 76:107-17.

Goodale D, Phay C, Postenka CO et al. Characterization of tumor cell dissemination patterns in preclinical models of cancer metastasis using flow cytometry and laser scanning cytometry. *Cytometry A* 2009b; 75:344-55.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997; 16:1647-55.

Gullick WJ. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: alternative strategies for targeting the epidermal growth factor system in cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3:390-4.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.

Harbeck N. [Breast cancer: tumor biology-based concepts for surgical and drug treatment]. *Dtsch Med Wochenschr* 2013; 138:180-2.

Harbeck N, Pegram MD, Rüschoff J et al. Targeted Therapy in Metastatic Breast Cancer: The HER2/neu Oncogene. *Breast Care (Basel)* 2010; 5:3-7.

Harris L, Fritsche H, Mennel R et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287-312.

Hayashi N, Nakamura S, Tokuda Y et al. Prognostic value of HER2-positive circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2012; 17:96-104.

Hayashi N, Nakamura S, Yagata H et al. Chromosome 17 polysomy in circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a case series. *Int J Clin Oncol* 2011; 16:596-600.

Hayes DF, Smerage J. Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? *Clin Cancer Res* 2008; 14:3646-50.

Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D et al. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:1438-42.

Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:263-73.

Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA et al. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52:227-37.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 2002; 86:1449-56.

Holbro T, Beerli RR, Maurer F et al. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8933-8.

Horwitz AF, Hunter T. Cell adhesion: integrating circuitry. *Trends Cell Biol* 1996; 6:460-1.

Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007; 357:39-51.

Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198:165-84.

Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:2593-600.

Ignatiadis M, Perraki M, Apostolaki S et al. Molecular detection and prognostic value of circulating cytokeratin-19 messenger RNA-positive and HER2 messenger RNA-positive cells in the peripheral blood of women with early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2007a; 7:883-9.

Ignatiadis M, Rothé F, Chaboteaux C et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One* 2011; 6:e15624.

Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2007b; 25:5194-202.

Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L et al. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *J Pathol* 2005; 207:260-8.

Janni W. Manual Mammakarzinome- Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. In: Tumorzentrum München. München, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH; 2007.

Junttila TT, Akita RW, Parsons K et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* 2009; 15:429-40.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:5321-5.

Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996; 15:254-64.

Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol* 2006; 24:1940-9.

Khan AJ, King BL, Smith BD et al. Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:540-8.

Klapper LN, Glathe S, Vaisman N et al. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:4995-5000.

Konecny G, Pauletti G, Pegram M et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:142-53.

Koscielny S, Tubiana M, Lê MG et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984; 49:709-15.

Koutras AK, Fountzilas G, Kalogeras KT et al. The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; 74:73-8.

Kreienberg R, Albert U-S, Follmann M et al. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. In: Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.; 2012.

Kreienberg R, Möbus V, Jonat W et al. Mammakarzinom interdisziplinär. Springer Berlin Heidelberg; 2010.

Krishnamurthy S. The emerging role of circulating tumor cells in breast cancer. *Cancer Cytopathol* 2012; 120:161-6.

Krishnamurthy S, Bischoff F, Mikolajczyk S et al. Detection of Circulating Tumor Cells and HER2 Gene Amplification Status Using a Novel Microfluidic Platform (Cell Enrichment and Extraction Technology, CEETM). In: *Cancer Research*: December 15, 2010; 2010.

Kumar LG, Rudbeck L. Education Guide: Immunohistochemical (IHC) Staining Methods. In. 5 edn: DAKO North America, Carpinteria, California; 2009.

Kurbel S. Are HER1/EGFR interactions with ligand free HER2 related to the effects of HER1-targeted drugs? *Med Hypotheses* 2006; 67:1355-7.

Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:1033-67.

Latif Z, Watters AD, Dunn I et al. HER2/neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2003; 89:1305-9.

Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S et al. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989; 64:1914-21.

Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 2008; 68:5878-87.

Linnenbach AJ, Wojciorowski J, Wu SA et al. Sequence investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA733. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:27-31.

Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ et al. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* 1997; 139:1337-48.

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA et al. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1994; 125:437-46.

Lohrisch C, Piccart M. HER2/neu as a predictive factor in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2001; 2:129-35; discussion 36-7.

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998; 153:865-73.

Maetzel D, Denzel S, Mack B et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 2009; 11:162-71.

Mavroudis D. Circulating cancer cells. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 7:vii95-100.

Mayer JA, Pham T, Wong KL et al. FISH-based determination of HER2 status in circulating tumor cells isolated with the microfluidic CEE™ platform. *Cancer Genet* 2011; 204:589-95.

Meng S, Tripathy D, Shete S et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:9393-8.

Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:924-35.

Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P et al. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Oncol* 2011; 2011:252361.

Mimura K, Kono K, Hanawa M et al. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92:1253-60.

Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007; 26:6469-87.

Moebus V, Jackisch C, Lueck HJ et al. Intense dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide compared with conventionally scheduled chemotherapy in high-risk primary breast cancer: mature results of an AGO phase III study. *J Clin Oncol* 2010; 28:2874-80.

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J et al. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:4744-9.

Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:2376-85.

Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA et al. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:463-74.

Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 2009; 69:5627-9.

Munzone E, Nolé F, Goldhirsch A et al. Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2010; 10:392-7.

Munzone E, Nolé F, Zorzino L et al. Acquisition of HER2/neu over-expression on circulating tumor cells (CTCs) in patients(pts) with advanced breast cancer (ABC) during chemotherapy. In. ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) edn: Journal of Clinical Oncology; 2008.

Musolino A, Naldi N, Bortesi B et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1789-96.

Ménard S, Pupa SM, Campiglio M et al. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene* 2003; 22:6570-8.

Münz M, Kieu C, Mack B et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 2004; 23:5748-58.

Nagata Y, Lan KH, Zhou X et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004; 6:117-27.

Nagy P, Friedländer E, Tanner M et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005; 65:473-82.

Nagy P, Jenei A, Damjanovich S et al. Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol Oncol Res* 1999; 5:255-71.

Nahta R, Esteva FJ. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res* 2006; 8:215.

Negro A, Brar BK, Lee KF. Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:1-12.

Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 1:S9-13.

Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10:696-705.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:23-8.

- Oakman C, Pestrin M, Bessi S et al. Significance of Micrometastases: Circulating Tumor Cells and Disseminated Tumor Cells in Early Breast Cancer. *Cancers* 2010; 2:1221-35.
- Ohlschlegel C, Zahel K, Kradolfer D et al. [Intratumoral heterogeneity of HER2 status in breast carcinoma]. *Pathologe* 2010; 31 Suppl 2:292-5.
- Okegawa T, Pong RC, Li Y et al. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 2004; 51:445-57.
- Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001; 3:385-9.
- Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 2004; 64:5818-24.
- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008a; 26:1208-15.
- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A et al. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Res* 2005a; 7:R975-9.
- Pachmann K, Clement JH, Schneider CP et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 2005b; 43:617-27.
- Pachmann K, Dengler R, Lobodasch K et al. An increase in cell number at completion of therapy may develop as an indicator of early relapse: quantification of circulating epithelial tumor cells (CETC) for monitoring of adjuvant therapy in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008b; 134:59-65.
- Pachmann UA, Hekimian K, Carl S et al. Comparing Sequential Steps For Detection Of Circulating Tumor Cells: More Specific Or Just Less Sensitive? In. *WebmedCentral CANCER* 2011;2(2):WMC001490; 2011.
- Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1409-11.
- Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:448-56.
- Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; 253:180-204.
- Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* 2012; 38:68-75.

Pauli C, Münz M, Kieu C et al. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett* 2003; 193:25-32.

Pegram M, Slamon D. Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 2000; 27:13-9.

Peles E, Yarden Y. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays* 1993; 15:815-24.

Perez EA, Rodeheffer R. Clinical cardiac tolerability of trastuzumab. *J Clin Oncol* 2004; 22:322-9.

Pestrin M, Bessi S, Galardi F et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118:523-30.

Pestrin M, Bessi S, Puglisi F et al. Final results of a multicenter phase II clinical trial evaluating the activity of single-agent lapatinib in patients with HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells. A proof-of-concept study. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134:283-9.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1659-72.

Pinkas-Kramarski R, Eilam R, Alroy I et al. Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene* 1997; 15:2803-15.

Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Guarino BC et al. ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Mol Cell Biol* 1998; 18:6090-101.

Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H et al. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 1996; 15:2452-67.

Pinzani P, Salvadori B, Simi L et al. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Hum Pathol* 2006; 37:711-8.

Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:7479-91.

Polyak K. Is breast tumor progression really linear? *Clin Cancer Res* 2008; 14:339-41.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:265-73.

- Preiß J, Dornoff W, Hagmann F-G et al. Taschenbuch Onkologie – Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie. Germering/München: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH; 2012.
- Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 354:2103-11.
- Ravdin PM, Green S, Dorr TM et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992; 10:1284-91.
- Regitnig P, Schippinger W, Lindbauer M et al. Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J Pathol* 2004; 203:918-26.
- Riethdorf S, Fritsche H, Müller V et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13:920-8.
- Riethdorf S, Müller V, Zhang L et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res* 2010; 16:2634-45.
- Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2007/2008. In: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2012: 64-7.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-84.
- Rosen PP, Groshen S, Kinne DW et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11:2090-100.
- Rosen PP, Groshen S, Saigo PE et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989; 7:1239-51.
- Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14:320-68.
- Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 1:S3-8.
- Rüschoff J, Nagelmeier I, Hofmann M et al. [ErbB2 diagnostics in breast cancer--an update]. *Pathologe* 2009; 30:147-55.
- Sauter G, Lee J, Bartlett JM et al. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009; 27:1323-33.

Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:628-38.

Schmidt M, Hasenclever D, Schaeffer M et al. Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5849-55.

Schneider PM, Hung MC, Chiocca SM et al. Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1989; 49:4968-71.

Segatto O, King CR, Pierce JH et al. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* 1988; 8:5570-4.

Sehouli J. Tumorartige Läsionen und Tumoren der Brustdrüse. In: Bühling KJ; Friedmann W, eds. *Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe*: München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; 2009: 429-51.

Seidman A, Hudis C, Pierri MK et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002; 20:1215-21.

Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:61-6.

Silvestrini R, Daidone MG, Luisi A et al. Biologic and clinicopathologic factors as indicators of specific relapse types in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13:697-704.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-82.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707-12.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783-92.

Sleijfer S, Gratama JW, Sieuwerts AM et al. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *Eur J Cancer* 2007; 43:2645-50.

Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD et al. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 1999; 26:60-70.

Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G et al. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 98:179-84.

Spizzo G, Went P, Dirnhofer S et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 86:207-13.

Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002; 20:3404-12.

Stern DF, Kamps MP. EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *EMBO J* 1988; 7:995-1001.

Stickeler E, Maass N. Adjuvante Systemtherapie des Mammakarzinoms. In: *Der Gynäkologe*: Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2008; 8:621-7.

Tanner M, Kapanen AI, Junttila T et al. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2004; 3:1585-92.

Tewes M, Aktas B, Welt A et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115:581-90.

Thor A. HER2--a discussion of testing approaches in the USA. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 1:S101-7.

Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet* 1991; 7:149-54.

Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 2002; 3:769-78.

Trebak M, Begg GE, Chong JM et al. Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 2001; 276:2299-309.

Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM et al. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 2007; 171:386-95.

Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC et al. Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy. *J Clin Oncol* 2011; 29:4168-74.

Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD et al. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J* 1997; 16:4938-50.

Tzahar E, Waterman H, Chen X et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16:5276-87.

- Tzahar E, Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1377:M25-37.
- Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 18:977-84.
- van de Vijver M. Emerging technologies for HER2 testing. *Oncology* 2002; 63 Suppl 1:33-8.
- van den Engh G, Sachs R, Trask BJ. Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by a random walk model. *Science* 1992; 257:1410-2.
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10:251-337.
- van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH et al. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* 2010; 31:1913-21.
- Vance GH, Barry TS, Bloom KJ et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:611-2.
- Vanden Bempt I, Van Loo P, Drijkoningen M et al. Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. *J Clin Oncol* 2008; 26:4869-74.
- Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res* 2007; 9:R24.
- Wagner S, Wagner A, Brandner P et al. Update Mammakarzinom. *Frauenarzt* 2011; 52:787-91.
- Weiner DB, Liu J, Cohen JA et al. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 1989; 339:230-1.
- Williams MR, Todd JH, Ellis IO et al. Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: an eight year review of 704 cases. *Br J Cancer* 1987; 55:67-73.
- Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE et al. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 2003a; 285:50-8.
- Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH et al. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 2003b; 163:2139-48.
- Witton CJ. Structure of HER receptors and intracellular localisation of downstream effector elements gives insight into mechanism of tumour growth promotion. *Breast Cancer Res* 2003; 5:206-7.

- Witton CJ, Reeves JR, Going JJ et al. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003; 200:290-7.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:118-45.
- Wolman SR. Cytogenetic heterogeneity: its role in tumor evolution. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 19:129-40.
- Wolmark N, Wang J, Mamounas E et al. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001:96-102.
- Wong NS, Kahn HJ, Zhang L et al. Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 99:63-9.
- Wörmann B, Overkamp F, Rick O et al. Mammakarzinom der Frau – Leitlinie. In: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V. (DGHO); 2011.
- Wülfing P, Borchard J, Buerger H et al. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1715-20.
- Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:2177-84.
- Xenidis N, Perraki M, Kafousi M et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:3756-62.
- Xi L, Nicastrì DG, El-Hefnawy T et al. Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers. *Clin Chem* 2007; 53:1206-15.
- Xie D, Shu XO, Deng Z et al. Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:412-7.
- Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA et al. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt 1s required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 2002; 62:4132-41.
- Yano T, Doi T, Ohtsu A et al. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* 2006; 15:65-71.
- Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001; 61 Suppl 2:1-13.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127-37.

Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ et al. The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J Biol Chem* 1991; 266:1716-20.

Zidan J, Dashkovsky I, Stayerman C et al. Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br J Cancer* 2005; 93:552-6.

Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:161-73.

Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med* 2002; 8:17-23.

Čabiňáková M, Tesařová P. Disseminated and circulating tumour cells and their role in breast cancer. *Folia Biol (Praha)* 2012; 58:87-97.

9 Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katharina Pachmann für die Vergabe dieses spannenden Themas, die Möglichkeit als wissenschaftliche Hilfskraft für ein Semester in ihrer Arbeitsgruppe mitzuwirken und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Frau Prof. Pachmann hatte immer ein offenes Ohr für mich, als Probleme oder Fragen auftauchten und half, in einer stets freundlichen Art und Weise, diese zu lösen.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Onkologischen Forschungslabors für die Hilfe bei der Einarbeitung und die Integration ins Team bedanken. Insbesondere Dr. Torsten Kroll, Cornelia Jörke sowie Nadine Rüdiger haben mir mit vielen Tipps und Ratschlägen bei der Arbeit im Labor hilfreich zur Seite gestanden.

Weiterer großer Dank gilt meiner Frau Susanne, meiner Familie sowie meinen Freunden, Brenda, Stefan, Nadine, Steffi, Peter und Georg, die mich auf dem Weg des Studiums und bei der Verfassung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. K. Pachmann (Klinik für Innere Medizin II), Dr. Torsten Kroll (ehem. Klinik für Innere Medizin II).

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Koblenz, 30.10.2013

Benjamin Taubald

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Gebräuchliche HER2-Test- und Analyseverfahren (modifiziert nach Rüschoff et al. 2009)	13
Tabelle 2:	Verwendete Puffer und Lösungen	38
Tabelle 3:	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Kit (FISH-Kit)	39
Tabelle 4:	Labormaterial und Labortechnik	40
Tabelle 5:	Optische Geräte	41
Tabelle 6:	Patientendaten des Patientenkollektivs	52
Tabelle 7:	Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus in Absolut- und Relativwert	53
Tabelle 8:	Darstellung der eingesetzten adjuvanten und neoadjuvanten Chemotherapieregime	55
Tabelle 9:	Auflistung der Einzelanalysen	57
Tabelle 10:	Häufigkeitsverteilung des HER2-Status der CETC	59
Tabelle 11:	Zusammenhang zwischen dem HER2-Status der CETC und dem HER2-Status des Primärtumors	64
Tabelle 12:	Zusammenhang zwischen dem Metastasierungsstadium und dem HER2-Status der CETC	65
Tabelle 13:	Zusammenhang zwischen dem Hormonrezeptorstatus und dem HER2-Status der CETC	65
Tabelle 14:	Zusammenhang zwischen dem Hormonrezeptorstatus und dem HER2-Status der CETC	66
Tabelle 15:	Zusammenhang zwischen dem histologischen Grading und dem HER2-Status der CETC	66
Tabelle 16:	Zusammenhang zwischen dem Verlauf der CETC-Zahl und der Kinetik der HER2-amplifizierten Zellen	67

Tabelle 17: Schwierigkeiten bei der Detektion zirkulierender Tumorzellen	80
Tabelle 18: Studien zum Nachweis von HER2-positiven CTC/DTC bei HER2-negativem Primärtumor	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Testalgorithmus zur HER2-Bestimmung (modifiziert nach Rüschoff et al. 2009, Bilder von Prof. Rüschoff).	17
Abbildung 2:	Therapieoptionen beim invasiven Mammakarzinom (modifiziert nach DGHO- onkopedia Leitlinien 2010/11).	25
Abbildung 3:	Vereinfachtes Schema zur Darstellung von Konstellationen verschiedener Prognose- und Prädiktionsfaktoren und daraus resultierende mögliche Therapieoptionen.	27
Abbildung 4:	Scan^R Olympus IX81 ZDC.	41
Abbildung 5:	Fluoreszenzmikroskop „Axioplan 2 imaging“ mit „AxioCam“.	42
Abbildung 6:	Darstellung von vitalen zirkulierenden epithelialen Zellen im Scan^R- Mikroskop.	45
Abbildung 7:	Darstellung avitaler epithelialer Zellen im Scan^R-Mikroskop.	45
Abbildung 8:	Darstellung einer EpCAM-positiven Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop AXIOPLAN 2 mit den verschiedenen Farbfilttern.	50
Abbildung 9:	Übersicht zur Probenanalyse.	51
Abbildung 10:	Darstellung der Untergruppen hinsichtlich des immunhistochemisch bestimmten HER2-Status.	54
Abbildung 11:	Schema zur Einteilung in Untergruppen.	56
Abbildung 12:	Zusammenhang zwischen der CETC-Zahl und dem Amplifikationsstatus der CETC.	59
Abbildung 13:	Darstellung einer FISH-Analyse am formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe (Hicks et al. 2008).	60
Abbildung 14:	Darstellung von vier Granulocyten (A-D).	60

Abbildung 15:	Darstellung von EpCAM-positiven Zellen mit unterschiedlichem Amplifikationsgrad unter dem Orange-Filter des Fluoreszenzmikroskopes.	61
Abbildung 16:	Darstellung von sieben EpCAM-positiven Zellen mit unterschiedlichem Amplifikationsgrad von HER2/neu.	62
Abbildung 17:	Verlaufsdigramm einer Patientin mit 3 Messungen unter einer Chemotherapie mit Paclitaxel.	69
Abbildung 18:	Verlaufsdigramm einer Patientin mit 3 Messungen unter einer Chemotherapie mit Docetaxel.	69
Abbildung 19:	Verlaufsdigramm einer Patientin mit 4 Messungen.	70
Abbildung 20:	Diagramm zur Darstellung des gleichsinnigen Zusammenhangs zwischen CETC-Zahl und CETCs mit HER2-Amplifikation bei drei Verlaufsmessungen einer Patientin unter einer FEC-Chemotherapie.	71
Abbildung 21:	Diagramm zur Darstellung des gleichsinnigen Zusammenhangs zwischen CETC-Zahl und CETCs mit HER2-Amplifikation bei vier Verlaufsmessungen einer Patientin.	72
Abbildung 22:	Diagramm zur Darstellung des gleichsinnigen Zusammenhangs zwischen CETC-Zahl und CETCs mit HER2-Amplifikation bei sechs Verlaufsmessungen einer Patientin.	73
Abbildung 23:	Darstellung der Häufigkeitsverteilung zur Änderung des Anteils HER2-amplifizierter CETC.	74
Abbildung 24:	Darstellung einer EpCAM-negativen Zelle mit HER2-Amplifikation.	75
Abbildung 25:	Darstellung von vier EpCAM-positiven CETC im Grünfilter mit vermutlich mehr als zwei CEP17-Signalen.	76